



Sören Linsel

**Experimentelle Untersuchungen zum
Proliferationsverhalten von NSCLC-Zelllinien
unter Endotoxin-Stimulation**

-
Die Rolle des
Cyclooxygenase-Metabolismus

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique ✨
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Experimentelle Untersuchungen zum Proliferationsverhalten von NSCLC-Zelllinien unter Endotoxin-Stimulation

-

Die Rolle des Cyclooxygenase-Metabolismus

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Sören Linsel

aus Nordhausen

Gießen 2015

Aus dem Zentrum für Innere Medizin,
Medizinische Klinik IV/V
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. F. Grimminger

Gutachter: PD Dr. U. Gradel

Gutachter: Prof. Dr. M. Kracht

Tag der Disputation: 12. April 2016

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Lungenkarzinom	1
1.2	Infektionen, Inflammationen und Tumorerkrankungen	8
1.3	Das Endotoxin Lipopolysaccharid	10
1.4	Die Cyclooxygenase als zentrales Enzym	12
1.5	EP - Die Prostaglandinrezeptoren	14
1.6	Vascular Endothelial Growth Factor	16
1.7	Fragestellung	19
2.	Material und Methodik	20
2.1	Verwendete Zelllinien und ihre Medien	20
2.2	Kultivierung und Passagierung der Zelllinien	21
2.3	Messung der Zellproliferation mittels automatisierter Zellzahlmessung im CasyR Zellcounter	23
2.4	Messung der Zellproliferation mittels MTS-Assay	26
2.5	Messung der Zellproliferation mittels BrdU ELISA	28
2.6	Messung der Zellproliferation mittels ³ H-Thymidin-Assay	30
2.7	Zellzahlmessung unter pharmakologischer Inhibition von COX-Isoformen und COX-Metaboliten	32
2.8	Prostaglandin E ₂ und Thromboxan A ₂ Bestimmung mittels ELISA	34
2.9	Messung der Prostaglandinrezeptor-Expressionsprofile mittels RT-PCR	37
2.10	VEGF Bestimmung mittels ELISA	39
2.11	Statistische Auswertung	41
3.	Ergebnisse	42
3.1	Überblick	42
3.2	Untersuchungen zum Effekt von LPS auf die Proliferation von NSCLC-Zelllinien anhand der Zellzahlmessung	44
3.3	Untersuchungen zum Effekt von LPS auf die Zellproliferation mittels Quantifizierung der Stoffwechselaktivität (MTS-Assay)	48
3.4	Untersuchungen zum Effekt von LPS auf die Proliferation von NSCLC-Zelllinien auf Ebene des Baseneinbaus in die DNA (BrdU ELISA und ³ H-Thymidin-Assay)	51
3.5	Effekt von Inhibitoren des COX-Stoffwechsels auf die LPS-induzierte Zellproliferation	54
3.6	Effekt von LPS auf die Freisetzung von Prostaglandin E ₂ und Thromboxan A ₂	56
3.7	Prostaglandinrezeptor-Expressionsprofile	57

3.8	Effekt des Prostaglandinrezeptor-Antagonisten AH-6809 auf die LPS-induzierte Zellproliferation	59
3.9	Inhibitorischer Effekt des EP-Antagonisten auf die LPS-mediierte VEGF-Sekretion	61
4.	Diskussion	64
4.1	Entwicklung der Fragestellung	64
4.2	LPS induziert eine zeit- und dosisabhängige Proliferationszunahme an allen NSCLC-Zelllinien: Diskussion der unterschiedlichen Nachweisprinzipien.....	66
4.3	COX-2-Inhibition hemmt selektiv die LPS-induzierte Proliferationszunahme	69
4.4	Unter den COX-Produkten wird Prostaglandin E ₂ präferenziell nach Endotoxin-Stimulation sezerniert	71
4.5	Die Schlüsselrolle der Prostaglandinrezeptoren bei der LPS-induzierten Tumorphiliferation.....	72
4.6	Die COX-2-Aktivierung stimuliert über einen autokrinen Loop eine EP-mediierte VEGF-Sekretion	74
4.7	Ausblick	76
5.	Zusammenfassung	79
6.	Summary	81
7.	Literaturverzeichnis	83
8.	Abkürzungs- und Fremdwortverzeichnis	94
9.	Publikationen	96
10.	Erklärung zur Dissertation	97
11.	Danksagung	98
12.	Lebenslauf	99

1. Einleitung

1.1 Lungenkarzinom

Epidemiologie

Jahr für Jahr nimmt die Anzahl der neu aufgetretenen Fälle für Krebserkrankungen zu. Das Lungenkarzinom bei Männern steht an erster Stelle der weltweiten Statistiken für Inzidenz und Mortalität bei Krebserkrankungen. Bei Frauen lag das Lungenkarzinom im Jahr 2012 an vierter Stelle, allerdings zeigt sich über die letzten Dekaden ein steigender Trend bei diesen Neubildungen. Für Männer zeigt sich ein eher gleichbleibender Trend, da auf der einen Seite besonders in der westlichen Welt immer weniger Neuerkrankungen von Lungenkarzinomen auftreten, auf der anderen Seite aber ärmere Länder, wie Indien, immer mehr Neuerkrankungen verzeichnen.¹

Ein ganz ähnlicher Verlauf lässt sich auch für Deutschland zeigen. Im Jahr 2010 lag die Zahl der bösartigen Neuerkrankungen der Lunge bei Männern an zweiter und bei Frauen an dritter Stelle der Statistiken, nur Prostatakrebs bei Männern und Brustdrüsen-, sowie Darmkrebs bei Frauen verzeichneten höheren Neuerkrankungszahlen. Der weltweite Trend, eines Anstiegs der Neuerkrankungen für Lungenkarzinome bei Frauen kann auch in den letzten 10 Jahren für Deutschland bestätigt werden, ebenso ist ein Rückgang bei Männern zu verzeichnen. Doch trotz dieser unterschiedlichen Tendenzen zwischen den Geschlechtern lag die Neuerkrankungsrate für Lungenkarzinome im Jahr 2010 für Männer mit etwa 61/100 000 Einwohner deutlich über der Neuerkrankungsrate für Frauen mit etwa 27/100 000 Einwohner. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate lag 2009-2010 bei 16 % bei Männern und 21 % bei Frauen.²

Diese Daten verdeutlichen nicht nur den Stellenwert, den diese Krebserkrankungen bereits heute haben, sondern auch deren Einfluss auf das zukünftige gesellschaftliche Leben und die drastischen Folgen der Diagnose "Lungenkrebs" für die betroffenen Menschen.

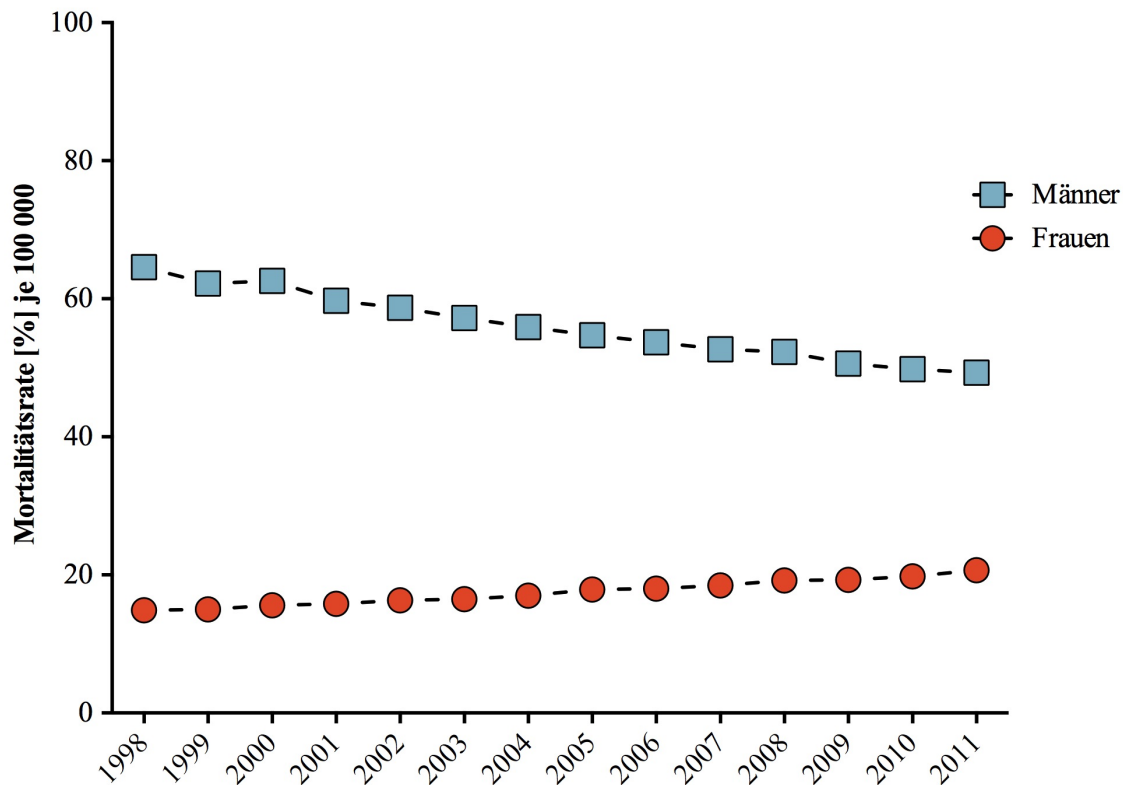


Abbildung 1: Mortalitätstrends für Lungenkrebs (ICD-10 C34) in Deutschland.
Altersstandardisierte Mortalitätsrate je 100 000 Einwohner (Europabevölkerung).²

Histologische Einteilung

Tumoren, welche ursprünglich ausgegangen sind von epithelialen oder neuroendokrinen Zellen des zentralen oder mediären Bronchialsystems, werden als Lungenkarzinome bezeichnet.³ Unterschieden wird zwischen kleinzelligen (small cell lung cancer, SCLC) und nicht-kleinzelligen (non-small cell lung cancer, NSCLC) Lungenkarzinomen. Die SCLC machen unter den Lungenkarzinomen einen Anteil von 14% aus. Die NSCLC mit einem Anteil von 84% unterteilen sich nochmals in Adenokarzinome (43%), Plattenepithelkarzinome (16%), großzellige Lungenkarzinome (3%) und andere histologische Typen (22%).⁴ Diese Verteilung der Subtypen unterlag in den letzten Jahren einer Veränderung, so stieg der Anteil der Adenokarzinome an und löste die Plattenepithelkarzinome als häufigsten Tumorsubtyp ab.⁵ Die unterschiedliche Histologie und Morphologie hat auch Einfluss auf die Diagnose, den klinischen Verlauf und die Prognose der Patienten, je nach Wachstums-, Metastasierungs- und Therapieverhalten der einzelnen Subtypen.³ Obwohl die Einteilung in Subtypen eine

große Bedeutung hat, werden auch zunehmend molekulare Marker für Prognose und Therapie mit herangezogen. Gerade bei Adenokarzinomen können bei vielen Patienten weitere Unterscheidungen auf Grund von Mutationen getroffen werden. Eine der ersten entdeckten Mutationen mit klinischer Relevanz war die Mutation des epidermal growth factor receptors (EGFR).⁶ Weitere Mutationen wurden gefunden bei v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF) und einer Translokation der anaplastic lymphoma kinase (ALK).^{7,8} Beispielsweise konnte für die BRAF-Mutation V600E gezeigt werden, dass signifikant mehr Frauen betroffen sind, dass diese Mutation häufiger in NSCLC-Patienten zu finden ist als in SCLC-Patienten und dass Tumore mit dieser Mutation aggressiver wachsen und daher mit einem kürzeren Überleben einhergehen.⁹

Ätiologie: Der wohl wichtigste Risikofaktor, der zur Entstehung von allen Entitäten des Lungenkrebs führen kann, ist der inhalative Zigarettenrauch.^{10,11} Andere karzinogene Stoffe, welche häufig bei beruflichen Tätigkeiten inhaliert werden und auf das pulmonale System Einfluss nehmen, sind Asbestfeinstaub, Kokereigase, radioaktive Strahlung im Bergbau, aber auch Chrom, Nickel, Arsen und Holzstäube.³ Auch eine genetische Disposition wird diskutiert, da das relative Risiko beim Faktor 1,8 liegt, wenn Familienmitglieder Betroffener bereits in jungen Jahren erkrankten.¹²

Klinik

Die Diagnose des Lungenkarzinoms in frühen Stadien erweist sich als äußerst schwierig, da keine eindeutigen Symptome wegweisend sind. Ein Viertel der Patienten klagt über Infekte, 20% leiden unter Thoraxschmerzen und nur etwa 15% leiden an Hämoptysen, Husten oder Atemnot. Von Heiserkeit, Abgeschlagenheit und Gewichtsverlust sprechen weniger als 5%. Doch die Liste der Symptome ist noch viel länger und vielfältiger. Durch Metastasen können Knochenschmerzen oder neurologische Defizite auffallend sein. Auch Lymphknotenmetastasen können lokal Schmerzen auslösen. Gerade die Atemnot kann durch die Verlegung von großen Bronchien durch schnelles Tumorstadium zügig voranschreiten. Aber auch hormonelle Entgleisungen können besonders durch SCLC und dessen neuroendokrine Zellen mit ACTH-Bildung entstehen. Diese unspezifischen Symptome sind oft schwer

einzuordnen und lassen die Diagnose des Lungenkarzinomes oft erst im fortgeschrittenen Stadium zu.¹²⁻¹⁴

Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung bei SCLC beinhaltet die Bezeichnungen "limited disease" und "extensive disease". Da die Mitoserate dieser Zellen sehr hoch ist, wodurch häufig Metastasen vorliegen, wird für den therapeutischen Ansatz nur zwischen diesen beiden Modalitäten unterschieden.⁵ Als "limited disease" wird ein Tumor bezeichnet, welcher auf einen Hemithorax begrenzt ist, mit oder ohne ipsi- oder kontralateralen mediastinalen oder supraklavikulären Lymphknotenmetastasen und mit oder ohne Pleuraerguss vorkommt. Jede weitere Ausdehnung wird als "extensive disease" bezeichnet.¹²

Komplexer ist die Stadieneinteilung des NSCLC, hier wird jeder Tumor nach der internationalen TNM-Klassifikation eingeteilt. Einfließend in die Stadienbewertung sind hier: Tumorausdehnung (Tis=Carcinoma in situ; T1-4), Befall regionaler Lymphknoten (N0-N3) und Fernmetastasen (M0/M1). Diese TNM-Klassifikation lässt sich auch in ein anderes Klassifikationsschema überführen, die UICC-Klassifikation. Bei der UICC-Klassifikation werden die Stadien I-IV unterschieden.¹³ Die aktuellste Auflage der UICC-Klassifikation (7. Auflage, geltend ab 2010) sowie deren Überführung in die TNM-Klassifikation nach dem Vorschlag der IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) zeigt Tabelle 1.

UICC	TNM		
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
Stadium IB	T2a	N0	M0
Stadium IIA	T1a	N1	M0
	T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Stadium IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
	T3 gleicher Lappen*	N0	M0
Stadium IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
	T3 gleicher Lappen*	N1	M0
	T3 gleicher Lappen*	N2	M0
	T4 Ausdehnung	N0	M0
	T4 Ausdehnung	N1	M0
	T4 Herd ipsilateral#	N0	M0
	T4 Herd ipsilateral#	N1	M0
Stadium IIIB	T4 Ausdehnung	N2	M0
	T4 Herd ipsilateral#	N2	M0
	jedes T	N3	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1a (maligner Pleura- oder Perikarderguss oder kontralaterale Metastase)
	jedes T	jedes N	M1b

Tabelle 1: Neue Stadieneinteilung nach Vorschlag der International Association for the Study of Lung Cancer (UICC 7. Auflage)

**Herd/e im gleichen Lappen, #Tumorherd/e im anderen Lungenlappen ipsilateral
Modifiziert nach ¹⁵*

Therapieoptionen

Beim SCLC spielt die Therapie des "limited disease" eine eher untergeordnete Rolle, da dieses Stadium äußerst selten diagnostiziert wird. Hier gäbe es neben der operativen Entfernung des Tumors noch die zusätzliche Chemotherapie als therapeutisches Vorgehen. Anders als bei "extensive disease" verfolgt man bei "limited disease" einen kurativen therapeutischen Ansatz. Patienten mit der Diagnose eines SCLC "extensive disease" werden mit einer Chemotherapie palliativ behandelt, um deren Lebenszeit und Lebensqualität zu erhöhen.^{15,16}

Ein anderes Vorgehen findet sich bei NSCLC, hier sollte in allen Stadien ohne Metastasierung, wenn möglich, ein operatives Vorgehen angestrebt werden, bei dem der Tumor mit einem Sicherheitsabstand zum gesunden Gewebe entfernt wird. Bei stark ausgeprägten Tumoren, die die Organgrenzen überschritten haben, ist auch eine neoadjuvante Radiochemotherapie in Erwägung zu ziehen. Die Operabilität jedes Patienten sollte, nach standardisierter Diagnostik, individuell diskutiert und entschieden werden.^{5,13} Wie individuell die Prognose und Therapie des NSCLC sind, zeigt auch die Entwicklung der Stadieneinteilung (Tabelle 1), welche in der aktuellsten Auflage durch weitere Unterscheidungen der Tumorgöße - zum Beispiel T1 in T1a und T1b - aktualisiert wurden. Den Behandlungsansatz von NSCLC stellt in Deutschland die Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft zur Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms dar.¹⁵ Im Stadium I/II/IIIA wird eine radikale Resektion (Lappenresektion) bei ausreichender kardiopulmonaler Funktion als primäres Ziel angestrebt. Sollte bei den Patienten auf Grund von Komorbiditäten oder Lungenfunktionseinschränkungen dieses Ziel nicht erreicht werden können, wird eine parenchymsparende Resektion oder eine Strahlentherapie empfohlen. Weiterhin sollten die Patienten mit dem Stadium II/IIIA nach R0-Resektion eine postoperative Chemotherapie erhalten. Eine postoperative Radiotherapie in den Stadien I/II und IIIA sollte nur durchgeführt werden, wenn der Tumor R1 reseziert wurde oder nicht operabel war. Im Stadium III, vor allem bei multiplem Lymphknotenbefall, wird eine Kombination aus adjuvanter Chemo- und Radiotherapie empfohlen.¹⁷ Bei den Stadien IIIB und IV weicht man von einer kurativen Behandlung ab und versucht mit palliativen Maßnahmen die begrenzte Lebenszeit (Median 8-12 Monate) so gut es geht positiv zu

beeinflussen. Bei der Erstlinientherapie stehen cisplatinbasierte Kombinationschemotherapeutika für Patienten mit gutem Allgemeinzustand an erster Stelle. Doch gerade die letzten Jahre haben viele neue Erkenntnisse in diesem Bereich gebracht, so dass ein neuer Ansatz, die "targeted therapy", Einzug in die aktuellsten Leitlinien zur Tumorthherapie nicht nur bei NSCLC genommen und etabliert hat. Bei diesem Ansatz werden durch Pharmaka gezielt Mediatoren oder Rezeptoren als Zielstrukturen genutzt. Bei nicht-Plattenepithelkarzinomen konnte durch den monoklonalen Antikörper gegen VEGF (vascular endothelial growth factor) Bevacizumab in Kombination mit cisplatinhaltigen Chemotherapeutika eine signifikante Verbesserung der Remissionsrate und des medianen progressionsfreien Überlebens gezeigt werden. Entsprechend gibt die Leitlinie - mit Berücksichtigung der Kontraindikation für Bevacizumab - eine Kombinationstherapie auch als Erstlinientherapie bei gutem Allgemeinzustand an. Aber auch Antikörper wie Cetuximab, gerichtet gegen EGFR (epidermal growth factor receptor), oder Substanzen, die dem EGFR nachgeschaltete Tyrosinkinasen hemmen (Erlotinib, Gefitinib, Afatinib), konnten in Studien eine signifikante Überlegenheit bei der Remissionsrate sowie beim progressionsfreien Überleben im Vergleich zwischen Kombinations- und Monotherapie mit cisplatinhaltigen Pharmaka zeigen.^{15,18} Folglich sind mittlerweile auch Erlotinib, Gefitinib und Afatinib zur Therapie des NSCLC zugelassen, wobei Patienten mit aktivierenden Mutationen des EGFR eine besonders gute Therapieansprache zeigen.¹⁹⁻²¹ Crizotinib, ein Inhibitor des ALK-Transfusionsgens ist für Patienten mit positiver ALK-Translokation Therapie der ersten Wahl im NSCLC, da diese Patienten eine schnelle Therapieansprache und lange Remissionsrate bei relativ geringen Nebenwirkungen dieser "targeted therapy" zeigen.²²

1.2 Infektionen, Inflammationen und Tumorerkrankungen

Chronische Infektionen werden schon seit vielen Jahren mit der Entstehung von malignen Tumoren in Verbindung gebracht.²³ Nahezu jeder fünfte bösartige Tumor ist zurückzuführen auf ein infektiöses Geschehen.²⁴ Die höchste Neuerkrankungsrate weltweit zeigen Magenkarzinome, ausgelöst durch *Helicobacter pylori*, Leberkarzinome, ausgelöst durch Hepatitis B und C Viren, und Zervixkarzinome, ausgelöst durch Humane Papilloma Viren.^{23,24} Eine wichtige Funktion bei der Karzinogenese durch Bakterien oder Viren spielt vor allem die Entzündungsreaktion, wodurch verschiedene weitere Schritte bedingt werden. So wird unter anderem eine Instabilität des Genoms, eine Resistenz gegen Apoptose und eine verstärkte Vaskularisierung durch Sekretion von unterschiedlichen proinflammatorischen Mediatoren wie Zytokinen, Chemokinen, Cyclooxygenase-2 und Prostaglandinen diskutiert.^{25,26} Auslösende Faktoren für solche Entzündungsreaktionen müssen nicht nur Bakterien oder Viren sein. Viele Krebserkrankungen sind zwar mit chronischen Entzündungen assoziiert, bei ihnen kann aber kein direkter Zusammenhang mit infektiösen Erregern dargestellt werden.^{26,27} Beispielsweise geht eine chronische Pankreatitis mit einem erhöhten Risiko für ein Pankreaskarzinom einher²⁸, ähnliche Zusammenhänge zeigen sich bei einem Barrett-Ösophagus und Ösophaguskrebs²⁹, bei einer Hashimoto Thyroiditis und papillären Schilddrüsenkarzinomen³⁰, bei Asbestose und Mesotheliomen³¹, bei Morbus Chron/Colitis Ulcerosa und kolorektalen Karzinomen³², sowie bei parasitären Infektionen mit Trematoden wie Schistosomen und Blasen- bzw. Gallenwegskarzinomen³³.

Ebenso konnte für Lungenkarzinome ein Zusammenhang zwischen der Krebsentstehung und chronischen Infektionen gezeigt werden.³⁴

Obwohl es keinen gesicherten Zusammenhang zwischen spezifischen infektiösen Erregern und Lungenkarzinomen gibt, zeigen eine große Anzahl an Patienten mit Lungenkarzinomen eine Infektion der unteren Atemwege mit gramnegativen Erregern wie *Haemophilus influenzae* oder *Moraxella catarrhalis*, oder grampositiven, wie *Streptokokkus pneumoniae*^{35,36}, häufig können diese Erreger bereits bei der Diagnose des Lungenkarzinoms mittels bronchioalveolärer Lavage nachgewiesen werden³⁷. Auch andere Studien zeigen nicht nur einen zeitlichen Zusammenhang zwischen einem Auftreten von Infektionen im Bereich der Atemwege und der Diagnose und Therapie

von Lungenkrebs auf, sondern auch deren Pathophysiologie. Gerade durch den Einsatz von Chemotherapeutika, welche Neutropenien verursachen können, wird eine Situation erzeugt, die prädisponierend für Lungenentzündungen sein kann.³⁸ Noch dazu sind solide Tumoren und chronische Lungenerkrankungen zwei der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von nosokomialen Infektionen.³⁹

Beide Erkrankungen, Lungenkarzinome und Infektionen bzw. die Inflammation der Lunge, sollen im Folgenden im Zusammenhang dargestellt werden. Dass die Inflammation einen hohen Stellenwert in der Tumorpromotion einnimmt, wird auch unter anderem durch die Definition der Inflammation als charakteristisches Merkmal von Tumoren verdeutlicht.⁴⁰ Die Behandlung von Pneumonien nimmt bei Lungenkarzinompatienten einen hohen Stellenwert ein, da nicht nur Lungenkarzinome die Entstehung von Pneumonien bedingen, sondern die Behandlung auch erschweren. Aber einige Studien zeigen auch einen umgekehrten Zusammenhang: Lungenentzündungen könnten möglicherweise das Tumorwachstum von Lungenkarzinomen beeinflussen⁴¹ und somit eine erhöhte Sterblichkeit und geringere 5-Jahres-Überlebensraten bedingen. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass Lipopolysaccharid (LPS, syn.: Endotoxin) ein Zellwandbestandteil gramnegativer Keime an der NSCLC-Zelllinie A549, an humanen Gewebekulturen und in einem Xenotransplantatmodell zum Lungenkarzinom, zu einer gesteigerten Tumorphiliferation führt.⁴²

Die möglichen pathophysiologischen Signalwege im Endotoxin-stimulierten Tumorwachstum sollen in der hier vorliegenden Arbeit genauer betrachtet werden, da an diesem Modell grundlegende Mechanismen der inflammatorischen Tumorphiliferation charakterisiert werden können und zur Entwicklung möglicher Perspektiven für zukünftige zielgerichtete Therapien im Lungenkarzinom beigetragen werden könnte.

1.3 Das Endotoxin Lipopolysaccharid

Entzündungsreaktionen können auf vielfältigen Wegen ausgelöst werden. Einen dieser Wege stellt der Kontakt von Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten mit Bakterien dar. Der Hauptpathogenitätsfaktor gramnegativer Keime, die beim NSCLC hauptsächlich gefunden werden³⁵, ist das LPS, auf welches in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk gelegt werden soll.

Der Aufbau von LPS, welches auf der äußeren Membran gramnegativer Bakterien vorhanden ist, bestehend aus der O-spezifischen Seitenkette, der Kernregion und dem Lipid A, weist bei unterschiedlichen Bakterien Ähnlichkeiten auf. Größte Gemeinsamkeiten im Aufbau bei verschiedenen Bakterien zeigt allerdings das Lipid A, welches besonders für die toxischen Eigenschaften des LPS verantwortlich gemacht wird.⁴³

Kommt es durch eine Immunantwort des Wirts oder durch therapeutische Pharmaka zum Zerfall der Bakterien, wird LPS freigegeben. Die Übertragung des LPS von der Bakterienmembran zu den Oberflächen-Rezeptoren der Zielzellen des Immunsystems erfolgt mittels LPS-Bindeprotein. Besonders Phagozyten exprimieren den Oberflächen-Rezeptor CD14, welcher LPS zu einem Signalkomplex weiterleitet, bestehend aus dem extrazellulärem Protein MD-2 und dem Transmembranrezeptor Toll-like Rezeptor 4 (TLR4). Doch nicht nur eine mit der Oberfläche verbundene Form des Rezeptors CD14 ist bekannt, sondern auch eine lösliche Form (sCD14). Dieser lösliche Rezeptor hat somit die Möglichkeit eine Bindung mit LPS und dem LPS-Bindungsprotein einzugehen und auch TLR4 auf CD14-negativen Zelloberflächen zu stimulieren, wodurch beispielsweise auch TLR4-exprimierende Tumorzellen spezifisch durch LPS aktiviert werden können. Nach der Verbindung des Komplexes aus LPS, LPS-Bindungsprotein und dem Rezeptor CD14 leitet TLR4 dieses Signal weiter in das Zellinnere, was zu der Aktivierung der Signalwege MAPK, ERK, JNK, p38 und IKK führt (Abbildung 2). Durch diese Aktivierung wird eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und dadurch aktiviert. Dies führt zur Freisetzung einer Fülle von Entzündungsmediatoren wie IL-1, IL-6, IL-8 und unter anderem TNF- α über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B.⁴⁴⁻⁴⁹

Kürzlich wurde gezeigt, dass sich der Toll-like Rezeptor 4 tatsächlich auch auf Tumorzellen in vivo quantifizieren lässt und die Dichte der Expression mit einer

schlechteren Prognose korreliert.⁵⁰ Vor dem Hintergrund, dass durch das "downstream" von TLR4 eine ganze Fülle von Signalkaskaden ausgelöst wird, gibt Hinweise darauf, dass über LPS nicht nur Signale angestoßen werden könnten, welche immunologische Zellen aktivieren und proliferieren lassen, sondern auch Signale, die das Wachstum von Tumorzellen beeinflussen.

Gerade das Wissen, dass viele Tumorpatienten bereits bei Diagnosestellung unter bakteriellen Infektionen leiden und dass diese Infektionen nicht nur parallel zur Tumorerkrankung auftreten, sondern diese voranschreiten lassen und vielleicht sogar bedingen könnten, zeigt eine große Bedeutung für das Endotoxin LPS in Zusammenhang mit Tumorerkrankungen.

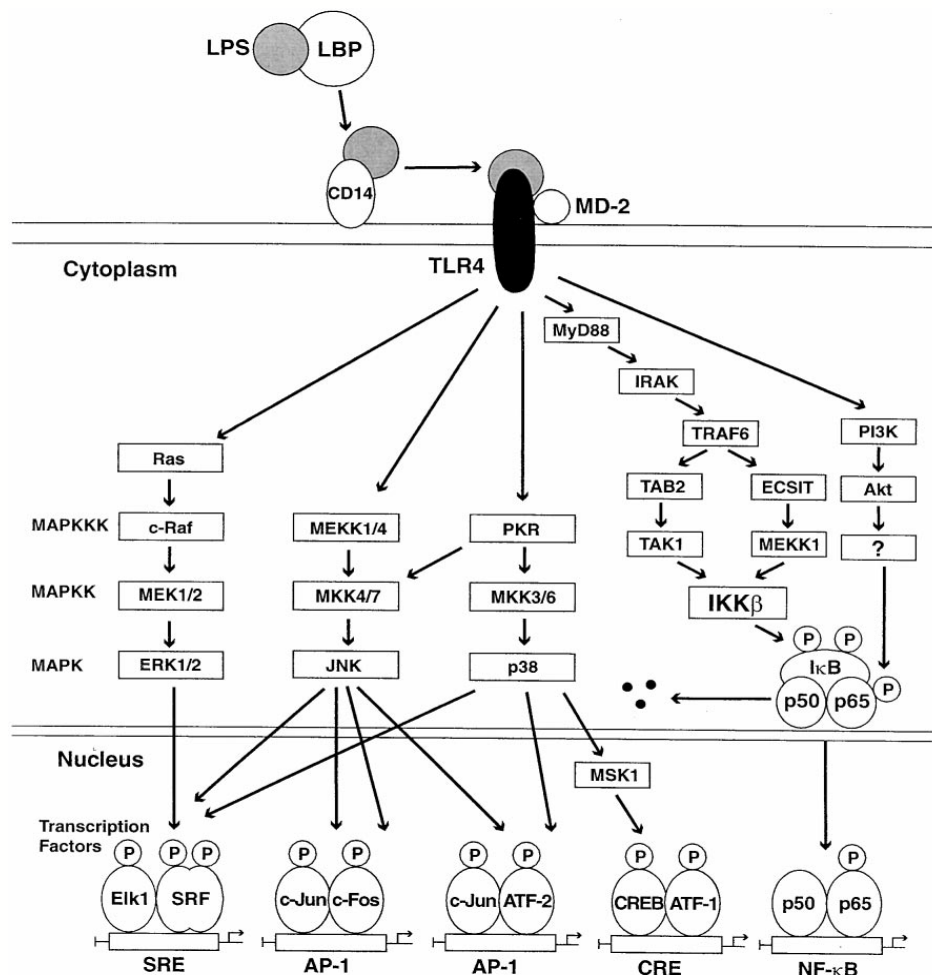


Abbildung 2: TLR4-Signalweg nach der Aktivierung mittels LPS

CD14: cluster of differentiation 14; LPS: Lipopolysaccharid; LBP: LPS-Bindungsprotein; TLR4: Toll-like Rezeptor 4

Modifiziert nach ⁴⁶

1.4 Die Cyclooxygenase als zentrales Enzym

Nahezu ubiquitär spielen Mediatoren des Arachidonsäurestoffwechsels, die Eicosanoide, bei physiologischen sowie pathophysiologischen Zellprozessen eine zentrale Rolle. Obwohl Arachidonsäure (AA) über drei bekannte Wege verstoffwechselt werden kann - über die Lipooxygenase zu Leukotrienen, über den Cytochrom-P450-Signalweg zu Epoxyeicosanoiden und über die Cyclooxygenasen zu Prostanoiden - soll insbesondere das Enzymsystem der Cyclooxygenasen (COX) im Folgenden dargestellt werden.⁵¹ Dass ein Zusammenhang zwischen der Entstehung von Neoplasien und der COX besteht, ist schon länger aus Studien bekannt, bei denen beispielsweise nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) verabreicht wurden und eine Minderung des Risikos an kolorektalen Karzinomen zu erkranken festgestellt werden konnte. NSAR wie Aspirin wirken als COX-Inhibitoren und verhindern somit die Entstehung der COX-abhängigen Produkte. Ähnliches zeigt sich auch für andere Tumore wie Mamma- oder Lungenkarzinome.⁵²⁻⁵⁵ Weiterhin ließ sich zeigen, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B wahrscheinlich eine Schnittstelle zur Hochregulation von COX-2 darstellt⁵⁶, somit die Balance der proinflammatorischen Zytokine aus dem Gleichgewicht bringt und zu unkontrollierter Zellteilung führt⁵⁷. NF- κ B wiederum, wie in Abschnitt 1.3 geschildert, kann durch bakterielle Strukturen wie LPS, über Toll-like Rezeptoren und die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Chemokinen aktiviert werden.

Die Produkte der COX, die Prostanoiden, entstehen durch die Übertragung von AA mit Hilfe der Phospholipase 2 auf die COX. Dieses Enzym liegt in drei Isoformen vor: der konstitutiven COX-1, der induzierbaren COX-2 und der COX-3, von deren Existenz berichtet wird, die jedoch in humanen Spezies eine eher untergeordnete Rolle spielt. Je nach Gewebeart kann auch die Expression dieser Enzyme unterschiedlich sein. Die Produkte der COX, die Prostanoiden, welche sich nochmals unterteilen in Prostaglandine (PG), Prostacycline und Thromboxane, werden über verschiedene Synthesen aus dem primären COX-Produkt Prostaglandin H₂ synthetisiert.⁵⁷⁻⁵⁹ Jeder dieser Mediatoren hat unterschiedliche Wirkungsweisen, so verursachen die Prostaglandine beispielsweise Broncho- und Vasodilatation, Thromboxane verursachen Vasokonstriktion und Thrombozytenaggregation und Prostacycline lösen eine Aggregationshemmung und Vasodilatation aus und haben protektive Wirkungen auf die Magenmukosa.⁶⁰ Doch auch bei den Prostaglandinen gibt es weitere Unterteilungen. PGE₂, PGD₂ und PGF_{2 α} weisen

ebenso Unterschiede in ihrer Wirkung auf. Besonders PGE_2 wird eine Rolle bei Entzündungen und Tumorwachstum zugeschrieben.^{58,61}

Es konnte gezeigt werden, dass in verändertem neoplastischem Gewebe vor allem die Isoform COX-2 exprimiert und somit quantifiziert werden kann⁶², bei etwa 70% - 90% der untersuchten NSCLC kann diese Überexpression im Vergleich zu gesundem Gewebe festgestellt werden⁶³. Doch auch auf Ebene der Prostanoiden konnten Veränderungen zwischen gesundem und tumorösem Gewebe festgestellt werden. Beispielsweise wurden bei NSCLC höhere Konzentrationen an PGE_2 gemessen als bei SCLC^{64,65} und normalem Gewebe, aber geringere Mengen an Prostacyclinen und Thromboxanen⁶⁶.

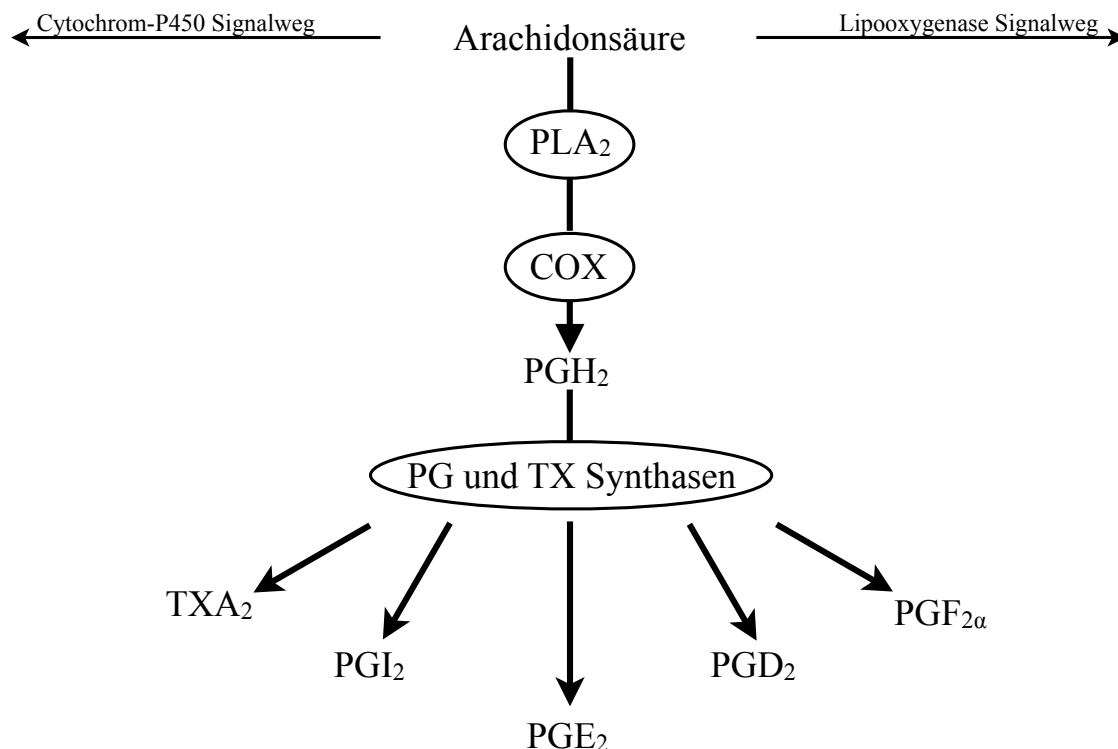


Abbildung 3: Übersicht über den Cyclooxygenase-Signalweg des Arachidonsäuremetabolismus

COX: Cyclooxygenase; PG ($E_2, D_2, F_{2\alpha}$): Prostaglandin ($E_2, D_2, F_{2\alpha}$); PG und TX Synthasen: Prostaglandin und Thromboxan Synthasen; PGH₂: Prostaglandin H₂; PGI₂: Prostaglandin I₂ (entspricht Prostacyclin); PLA₂: Phospholipase 2; TXA₂: Thromboxan A₂

Modifiziert nach ^{58,59,61}

1.5 EP - Die Prostaglandinrezeptoren

Die alleinige vermehrte oder verminderte Synthese einzelner Prostaglandine lässt noch keinen direkten Rückschluss auf die vermittelte Wirkung in den Zielgeweben zu, da jedes Prostaglandin nochmals eine Gruppe spezifischer 7-transmembraner G-Protein-gekoppelter Rezeptoren mit unterschiedlichen Signalwegen ansteuert. Die Nomenklatur gibt vor, dass jeder Rezeptor (P) als Präfix in der Abkürzung den Buchstaben des jeweiligen Prostaglandins, welches hauptsächlich gebunden wird, bekommt und die Rezeptoren, sollten es mehrere sein, durchnummeriert werden. Somit heißen beispielsweise alle Rezeptoren des Prostaglandins E_2 (PGE_2) Prostaglandinrezeptor E (EP).⁵⁹ Da in der folgenden Arbeit ausschließlich auf PGE_2 und dessen Rezeptoren eingegangen wird, bezieht sich der Begriff Prostaglandinrezeptor im Folgenden ausschließlich auf die EP-Rezeptoren.

Das PGE_2 besitzt vier Subtypen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), deren Aktivierung unterschiedliche Signalwege induziert. EP2 und EP4 führen beide zu einer Erhöhung des cyclischen Adenosinmonophosphates (cAMP) über einen stimulierenden GPCR (G_s), wodurch sie als redundantes System verstanden werden können. Der EP1 erhöht über noch unbekannte Wege die intrazelluläre Konzentration von Ca^{2+} . Die Hauptaufgabe der EP3 ist die Senkung der cAMP-Konzentration über einen inhibierenden GPCR (G_i), jedoch aktiviert jede Isoform noch andere Signalwege, wie in Tabelle 2 dargestellt ist.⁶⁷

PGE_2 kann über diese EP-Rezeptoren eine Vielzahl von Wirkungen auslösen, beispielsweise die Synthese von VEGF, die zu vermehrter Angiogenese führt, die verstärkte Aktivierung des EGFR, was eine Blockierung der Apoptose und vermehrte Zellinvasion zur Folge hat, und die Aktivierung des Proto-Onkogens Ras, welche über weitere Signalkaskaden eine verstärkte Zellproliferation hervorruft.⁶¹

Subtyp	Isoform	G-Protein	Signalwege
EP1		unbekannt	$\text{Ca}^{2+}\uparrow$
EP2		G_s	cAMP \uparrow
EP3	EP3 α	G_i	cAMP \downarrow , $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}\uparrow$, Rho
	EP3 β	G_i	cAMP \downarrow , $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}\uparrow$, Rho
	EP3 γ	G_i , G_s	cAMP \downarrow , cAMP \uparrow , $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}\uparrow$
EP4		G_s (G_i)	cAMP \uparrow , PI3K

Tabelle 2: Signaltransduktion der Prostaglandinrezeptorsubtypen und EP3-Isoformen

cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat; G_s : stimulierender G-Protein-gekoppelter Rezeptor; G_i : inhibierender G-Protein-gekoppelter Rezeptor; IP_3 : Inositoltriphosphat; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinasen; \uparrow : Erhöhung; \downarrow : Senkung
 Modifiziert nach ⁶⁷

1.6 Vascular Endothelial Growth Factor

Eine Gruppe von Proteinen, welche für die Entstehung und das Wachstum tumoreigener Gefäßen verantwortlich gemacht werden, sind die vascular endothelial growth factors (VEGFs). Sie werden auch als "endothelspezifisches Mitogen" bezeichnet, da sie die Einsprossung neuer Kapillaren ins Tumorbett bewirken.⁶⁸ Diese Tumorneoangiogenese ist für das Wachstum und die Dissemination maligner Tumoren essenziell, da Tumoren nur bis zu einem Durchmesser von 2-3 mm suffizient durch Diffusion perfundiert werden.⁶⁹ Als zelluläre Quelle von VEGF wurden hauptsächlich Tumorzellen selbst identifiziert. Hypoxie stellt einen wichtigen Stimulus für die Aktivierung der tumoreigenen VEGF-Sekretion dar, welche dann die Tumorneoangiogenese bewirkt. Insgesamt werden 7 VEGF-Subtypen beschrieben: VEGF-A, -B, -C, -D, -E, -F und PlGF (placental growth factor), welche jeweils weitere Isoformen aufweisen.⁷⁰

Diese Mediatoren besitzen drei unterschiedliche Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität, VEGFR-1, -2 und -3 (vascular endothelial growth factor receptor). Jeder dieser Rezeptoren leitet auch unterschiedliche Signalkaskaden weiter und bedingt verschiedene Wirkungen. VEGFR-1 bedingt vor allem die embryonale Gefäßneubildung und VEGFR-3 besonders die Lymphangiogenese. VEGFR-2 kommt im Hinblick auf Tumoren eine besondere Stellung zu, er hat Bedeutung für Zellmigrationen, Zellpermeabilität, das Überleben der Endothelzellen und die Angio- bzw. Vaskulogenese.^{70,71} Nicht jeder Rezeptor bindet auch jeden Liganden, eine Übersicht dazu zeigt Abbildung 4. Doch diese Signalwege finden sich nicht nur in normalem Gewebe, auch in Tumorzellen konnten VEGF und seine Rezeptoren, verstärkt VEGF-A und dessen Rezeptor VEGFR-2, gefunden werden.⁷²

Aufgrund dieser Erkenntnisse konnten auch neue Therapiestrategien bei Lungenkarzinomen Anwendung finden. So wurde - zunächst in klinischen Studien - bei NSCLC-Patienten unter anderem der VEGF-Antikörper Bevacizumab eingesetzt⁷³⁻⁷⁶, um das Tumorwachstum im fortgeschrittenen Tumorstadium einzudämmen und möglicherweise die Tumorgöße zu verringern. Zusammen mit platinhaltigen Chemotherapeutika konnte dieser VEGF-Antikörper die mittlere Gesamtüberlebenszeit auf über ein Jahr erhöhen, was zur Zulassung von Bevacizumab in der palliativen Therapie des nicht plattenepithelartigen NSCLC führte.⁷⁷

Bisher werden diese Angriffspunkte für Pharmaka nur bei der palliativen Behandlung von Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium angewendet. Ob und in wie weit die VEGF-Signalwege auch eine Rolle bei der kurativen Therapie spielen könnten, werden die nächsten Jahre zeigen, da gerade in diesem Bereich viel Forschungszeit investiert wird.⁷⁸⁻⁸⁰

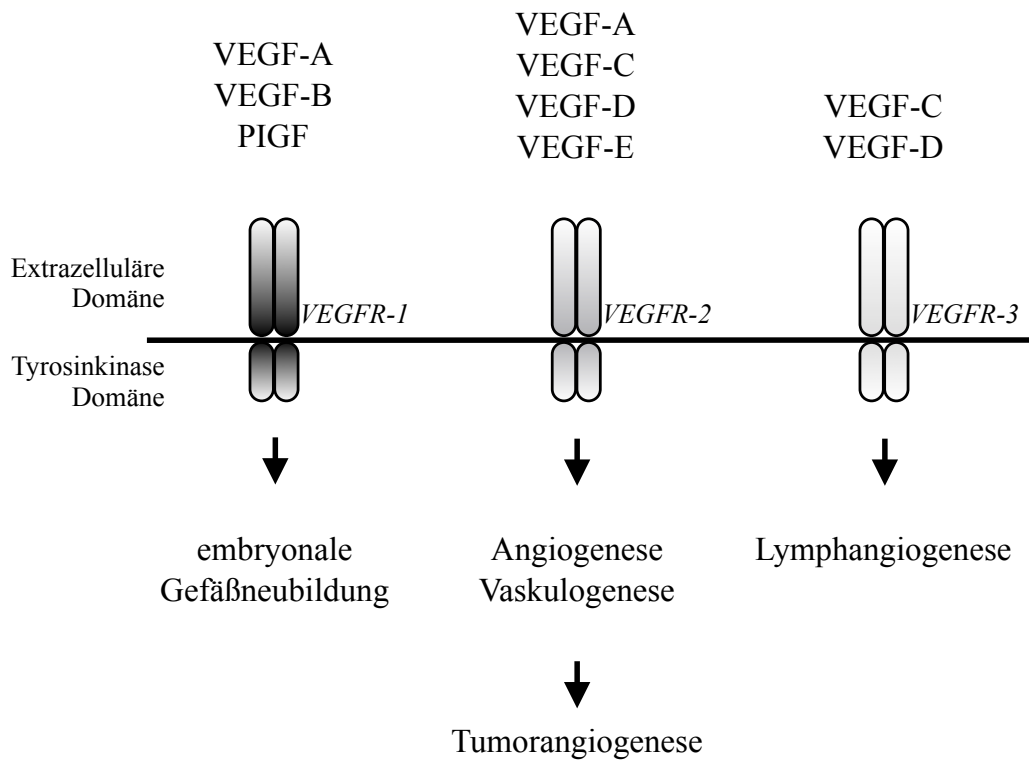


Abbildung 4: Vascular Endothelial Growth Factor und dessen Tyrosinkinase-Rezeptoren

VEGF: vascular endothelial growth factor; VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor; PlGF: placental growth factor

Modifiziert nach ^{70,71}

1.7 Fragestellung

Die bisher dargestellten Erkenntnisse werfen die Frage nach der Rolle des Endotoxins in der Tumorphiliferation des NSCLC auf. Sollte sich ein pro-proliferativer Effekt zeigen, werden die involvierten Mechanismen unter besonderer Berücksichtigung des COX-Metabolismus und der Rolle von nachgeschalteten Mediatoren und Rezeptoren im Einzelnen unter den folgenden Fragestellungen bearbeitet.

1. Ist unter LPS eine Proliferationszunahme humaner Adeno- (A549, H1299) und Plattenepithelkarzinomen (H226) mit den etablierten Proliferationsassays (automatische Zellzählung, MTS-Assay, BrdU ELISA, ³H-Thymidin-Assay) zu verzeichnen?
2. Hat eine Hemmung der konstitutiven und/oder induzierbaren Cyclooxygenase eine Auswirkung auf die Proliferationszunahme?
3. Induziert LPS eine Synthese der COX-Produkte PGE₂ und Thromboxan A₂ an den verwendeten Lungenkarzinomzelllinien?
4. Sind alle EP-Subtypen auf den verwendeten Zelllinien auf RNA-Ebene nachweisbar und unterliegen Prostaglandinrezeptoren unter Stimulation mit Endotoxin einer Regulation?
5. Welchen Effekt hat der Einsatz eines EP-Antagonisten auf die LPS-induzierte Proliferation der Tumorzelllinien?
6. Hat die LPS-Stimulation eine Auswirkung auf die VEGF-Sekretion der untersuchten Zelllinien und welchen Bezug haben Prostaglandinrezeptoren zum VEGF-System?

2. Material und Methodik

2.1 Verwendete Zelllinien und ihre Medien

A549 (Cat-No. CCL-185, ATCC- LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland)

H226 (Cat-No. CRL-5826, ATCC- LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland)

Kulturmedium:

- 86 % DMEM-F12 (Gibco life technologies, Darmstadt, Deutschland)
- 10 % FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- 1 % Glutamin 200 mM (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- 1 % nicht-essentielle Aminosäuren 10 mM (Gibco life technologies, Darmstadt, Deutschland)
- 1 % Penicillin/Streptomycin: 10 000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin (PAN BioTech GmbH, Aidenbach, Deutschland)

H1299 (Cat-No. CRL-5803, ATCC- LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland)

Kulturmedium:

- 10 % FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- 1 % Penicillin/Streptomycin: 10 000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin (PAN BioTech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- 89 % RPMI 1640 (PAN BioTech GmbH, Aidenbach, Deutschland)

2.2 Kultivierung und Passagierung der Zelllinien

Benötigte Materialien und Geräte:

- CO₂-Inkubator HeraCell 150 (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland)
- DPBS (PAN BioTech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- Falcon Polypropylene-Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- Reinluftbank MSC-Advantage (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland)
- T75-Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Trypsin (PAN BioTech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- Zentrifuge ROTANATA/AP (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)

Alle verwendeten Zellreihen wurden unter sterilen Bedingungen in einem CO₂-Inkubator bei 5% CO₂-Begasung und 37°C kultiviert. Das Passagieren erfolgte unter ebenso sterilen Bedingungen unter einer Reinluftbank mit laminarem Flow. Es wurden jeweils 500 000 Zellen in eine T75-Zellkulturflasche ausgesät, in der 15 ml des jeweiligen Kulturmediums vorgelegt waren. Das Kulturmedium wurde alle 2-3 Tage gewechselt und je nach Dichte des Zellrasens erfolgte nach 3-4 Tagen eine erneute Passagierung.

Dazu wurde der Überstand des Mediums abgesaugt und anschließend mit 8 ml DPBS gewaschen. Nach dem erneuten Absaugen wurden 6 ml Trypsin in die T75-Zellkulturflasche auf den Zellrasen gegeben, um die adhärenen Zellen vom Boden der Flasche zu lösen. Dies wurde für 2-3 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach einer Reaktionskontrolle unter dem Mikroskop wurde das Trypsin-Zell-Gemisch mit einer sterilen Pipette aufgenommen und in ein 50 ml Falconröhrchen, in dem 1 ml FCS vorgelegt war, gegeben, um die trypsinvermittelte Reaktion zu stoppen. Die T75-Zellkulturflasche wurde dann erneut mit 8 ml DPBS gewaschen und dies ebenso in das Falconröhrchen gegeben.

Nach einer Zentrifugation bei 250xg für 5 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet (durch Zentrifugation an den Boden des Falchonröhrchen gepresste Zellen) mit Kulturmedium gelöst. Durch eine Zellzählung in einer Neubauerkammer konnte die Menge des Kulturmediums so gewählt werden, dass die Zellkonzentration in

diesem Falconröhrchen etwa 1 Million Zellen/ml betrug. Von dieser Zelllösung wurden circa 500 μ l (500 000 Zellen) entnommen und in eine sterile T75-Zellkulturflasche ausgesät. Die restlichen Zellen wurden verworfen oder für anschließende Versuche benutzt.

2.3 Messung der Zellproliferation mittels automatisierter Zellzahlmessung im CasyR Zellcounter

Benötigte Materialien, Substanzen und Geräte:

- 24-Well-Platten Cellstar (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- CasyR Modell TT 150 μm Kapillardurchmesser (Innovatis AG, Reutlingen, Deutschland)
- DPBS (PAN BioTech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- LPS Escherichia coli 0111:B4 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Stopp-Solution (80 % DPBS + 20 % FCS)

Versuchsmedium für die Zellreihen A549 und H226:

- 97 % DMEM-F12 (Gibco life technologies, Darmstadt, Deutschland)
- 1 % FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- 1 % Penicillin/Streptomycin: 10 000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin (PAN BioTech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- 1 % Glutamin 200 mM (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Versuchsmedium für die Zellreihe H1299:

- 98 % RPMI 1640 (PAN BioTech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- 1 % FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- 1 % Penicillin/Streptomycin: 10 000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin (PAN BioTech GmbH, Aidenbach, Deutschland)

Kulturmedien wie in 2.1 beschrieben.

Der CasyR Modell TT Zellcounter arbeitet über eine Messung des Widerstandes durch die elektronische Pulsflächenanalyse von Schärfe System und ermittelt somit die unbeschädigten, lebenden Zellen des zu analysierenden Probevolumens.

Um den Effekt von LPS auf die Zellproliferation nachzuweisen, wurden die verschiedenen Zelllinien mit drei verschiedenen Konzentrationen von LPS und mit Versuchsmedium ohne LPS inkubiert. Bei gleichem Versuchsaufbau wurden für jede Zelllinie drei Messzeitpunkte (24, 48 und 72 Stunden) gewählt.

Bei diesem Versuchsaufbau wurden je 15 000 Zellen/500 µl Kulturmedium auf eine sterile 24-Well-Platte ausgesät. Für jede Zellreihe und jeden Messzeitpunkt wurde eine neue 24-Well-Platte benutzt, sodass pro Platte 8 Wells pro Zeitreihe genutzt wurden. Die Dauer der Inkubationsphasen der Zellreihen vor der Stimulation mit LPS bzw. mit Inhibitoren oder Antagonisten wurde an deren Verdopplungszeiten mit der entsprechenden Zellreihe definiert. Die Verdopplungszeit beträgt von A549 23,7 Stunden \pm 0,8 (n=16), von H1299 23,6 Stunden \pm 0,9 (n=28) und von H226 42,1 Stunden \pm 1,8 (n=39). Daher erfolgte nach einer Inkubationsphase von 24 Stunden bei A549 und H1299 und von 72 Stunden bei H226 ein Mediumwechsel zu einem 1% FCS-haltigen Versuchsmedium. Hierzu wurde jedes Well abgesaugt, mit etwa 500 µl DPBS gewaschen und dies erneut abgesaugt, sodass der Zellrasen am Wellboden möglichst nicht beschädigt wurde. Im Vorfeld wurde LPS im Versuchsmedium verdünnt, um die drei Konzentrationen 0,1 µg/ml; 1 µg/ml und 10 µg/ml LPS vorliegen zu haben. Diese Lösungen und das Versuchsmedium ohne LPS wurden daraufhin, wie in Tabelle 3 dargestellt, auf die adhären Zellen gegeben und erneut für 24, 48, bzw. 72 Stunden im CO₂-Inkubator bei 37 °C inkubiert. Der Versuchsaufbau wurde so gewählt, dass in jeder Konzentration Doppelwerte gemessen werden konnten.

	Kontrolle	0,1 µg/ml LPS	1 µg/ml LPS	10 µg/ml LPS	
	Kontrolle	0,1 µg/ml LPS	1 µg/ml LPS	10 µg/ml LPS	

Tabelle 3: Plattenaufteilung bei Zellzahlmessung mit CasyR Modell TT

Jedes Kästchen entspricht einem Well.

Nach der Inkubation im Versuchsmedium wurde dieses Medium abgesaugt, die Zellen wurden mit etwa 500 µl DPBS gespült, dies erneut abgesaugt und für etwa drei Minuten bei 37 °C mit 200 µl Trypsin pro Well inkubiert. Diese durch Trypsin gestartete Reaktion zum Lösen des Zellrasens vom Wellboden wurde durch die Zugabe der Stopp-Solution beendet. Je nach Zeitpunkt der Messung musste die Trypsin- und Stopp-Solution-Menge an die geschätzte Zellzahl im Well angepasst werden. Dies wurde in der Auswertung des entsprechenden Versuches berücksichtigt.

Die abgelösten Zellen konnten nun im CasyR Modell TT gemessen werden. Für jede Messung wurden 100 µl der Zellsuspension zu 5 ml Casy®ton in einem Casy®cup zugegeben und durch das Gerät gemessen. Der Messbereich wurde so gewählt, dass Fremdpartikel das Messergebnis nicht verfälschten.

Weiterhin wurde jeder Zellreihe bei jedem Versuch eine Referenz hinzugefügt. 4 Wells einer neuen Platte wurden mit derselben Zellzahl wie im Versuchsaufbau beschrieben ausgesät und am Tag der Inkubation mit LPS gemessen. Dieser Referenzwert wurde allen Messergebnissen der Zeitwerte abgezogen.

2.4 Messung der Zellproliferation mittels MTS-Assay

Benötigte Materialien, Substanzen und Geräte:

- 96-Well-Platten Cellstar (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland)
- DPBS (PAN BioTech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- LPS Escherichia coli 0111:B4 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Reader ELx808 Absorbance Microplate Reader (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland)

Kultur- und Versuchsmedien wie in Abschnitt 2.1 beziehungsweise 2.3 beschrieben.

Der MTS-Assay stellt die metabolische Aktivität lebender Zellen dar. Dabei wird 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) über verschiedene Dehydrogenasen der metabolisch aktiven Zellen zu Formazan reduziert. Durch diese Reaktion entsteht ein Farbumschlag von gelb zu blau-violett, welcher quantitativ bei einer Absorption von 490 nm gemessen werden kann. Das Ergebnis lässt einen direkt proportionalen Rückschluss auf die Anzahl lebender Zellen zu.

Auch hier sollte der Effekt von LPS auf die Zellproliferation aller drei Zellreihen unter verschiedenen LPS-Konzentrationen nachgewiesen werden. Dazu wurden die zwei Messzeitpunkte 8 und 24 Stunden gewählt.

Bei diesem Versuchsaufbau wurden 2 500 Zellen/200 µl Kulturmedium auf eine sterile 96-Well-Platte ausgesät. Für jede Zellreihe wurde je Messzeitpunkt eine neue Platte verwendet, auf der jeweils 15 Wells benutzt wurden. Die Inkubationsphase vor der Stimulation mit LPS von H226 wurde bei diesem Versuchsaufbau von 72 auf 48 Stunden verkürzt; der Vorstellung nach sollte die MTS-Substanz, wie auch unter 2.5 die BrdU-Substanz, vor dem nächsten Teilungszyklus vorliegen, um direkt in die neu geteilten Zellen eingebaut bzw. verstoffwechselt zu werden. Somit wurde nach einer Inkubationsphase von 24 Stunden bei A549 und H1299 und von 48 Stunden bei H226 ein Mediumwechsel zu einem 1 % FCS-haltigen Versuchsmedium durchgeführt. Hierzu wurde jedes Well abgesaugt, mit etwa 200 µl DPBS gewaschen und erneut abgesaugt. Im Vorfeld wurde LPS im Versuchsmedium verdünnt, sodass die drei Konzentrationen

0,1 µg/ml; 1 µg/ml; 10 µg/ml LPS vorlagen. Je 200 µl des Versuchsmediums ohne LPS wurden auf 6 Wells gegeben, je 200 µl der vorbereiteten LPS-Konzentrationen wurden auf je drei Wells gegeben (Tabelle 4). Den Abschluss jeder Reihe der inkubierten Zellen bildet der Blank, in dem nur das jeweilige Versuchsmedium ohne adhärenente Zellen am Wellboden enthalten war.

	K	K	K	Blank							
	K	K	K	Blank							
	0,1	0,1	0,1	Blank							
	1	1	1	Blank							
	10	10	10	Blank							

Tabelle 4: Plattenaufteilung bei MTS-Assay

Jedes Kästchen entspricht einem Well.

Angegeben sind die LPS-Konzentrationen in µg/ml bzw. die Kontrolle (K) für das Versuchsmedium ohne LPS.

90 Minuten vor dem jeweiligen Messzeitpunkt wurden 20 µl CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent in jedes der 20 Wells gegeben und für 90 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Direkt im Anschluss wurden die Platten bei 490 nm im ELISA Microplate Reader gemessen.

2.5 Messung der Zellproliferation mittels BrdU ELISA

Benötigte Materialien, Substanzen und Geräte:

- 96-Well-Platten Cellstar (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland)
- DPBS (PAN BioTech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- LPS Escherichia coli 0111:B4 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Reader ELx808 Absorbance Microplate Reader (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland)
- 1 molare Schwefelsäure (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

Kultur- und Versuchsmedien wie in Abschnitt 2.1 beziehungsweise 2.3 beschrieben.

Der Cell Proliferation ELISA ist ein Test zum Nachweis von Zellvermehrung bei sich teilenden Zellen. Dabei wird 5-Brom-2'-Deoxyuridin (BrdU), welches ein Pyrimidinanaloga darstellt, anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut. Durch die Zugabe von monoklonalen Antikörpern, welche spezifisch an das eingebaute BrdU binden können, kommt ein Farbumschlag durch zusätzliche Bindungen einer Peroxidase an dem Antikörper (anti-BrdU-POD) zustande. Dieser Farbumschlag kann in einem ELISA Microplate Reader gemessen werden.

In diesem Versuchsaufbau sollte die LPS-abhängige Proliferationszunahme unter verschiedenen LPS-Konzentrationen anhand der Zellreihe A549 nachgewiesen werden. Dazu wurden die drei Messzeitpunkte 8, 24 und 48 Stunden gewählt.

Der Versuchsaufbau dieser Versuchsreihe entspricht den Versuchen des MTS-Testverfahrens wie in Abschnitt 2.4 beschrieben.

20 µl der BrdU-Label-Substanz wurden direkt bei der Inkubation mit LPS zugegeben. Danach wurde das Medium durch vorsichtiges Klopfen aus den Wells entfernt und die Platten wurden bis zur Durchführung des ELISA bei 4°C aufbewahrt. Alle weiteren Schritte dieses ELISA wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Als Nächstes folgte die Fixierung der Zellen, dazu wurden 200 µl FixDenat in jedes Well pipettiert. Nach 30 Minuten wurde dies wieder durch leichtes Klopfen entfernt und 100 µl des Antikörpers anti-BrdU-POD wurden in jedes Well gegeben, es erfolgte eine Inkubation mit dem Antikörper für 90 Minuten. Nach dem Ausklopfen der

Antikörperlösung und dreimaligem Waschen mit je 200 µl Waschlösung wurden 100 µl der Substratlösung Tetramethyl-Benzidin hinzugegeben, wodurch ein Farbumschlag entstand. Nach etwa 25 Minuten wurde diese Farbumschlagreaktion mit 25 µl H₂SO₄ beendet und die Absorption konnte bei 450 nm gemessen werden. Der Blank wurde von den jeweiligen Mittelwerten abgezogen. Eine Backgroundkontrolle mit Zellen, die nicht mit BrdU markiert, aber mit Anti-BrdU-POD Antikörpern inkubiert wurden, wurde einmal durchgeführt. Die Absorption dieser Werte war kleiner 0,1 und gab Information über die unspezifische Bindung der Antikörper mit den Zellen der Zellreihe A549.

2.6 Messung der Zellproliferation mittels ^3H -Thymidin-Assay

Benötigte Materialien, Substanzen und Geräte:

- ^3H -Thymidin (1,5 $\mu\text{Ci/mL}$; Amersham Biosciences, München, Deutschland)
- 48-Well-Platten Cellstar (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- beta-Zähler Scintillation Counter LS 6500 (Beckman Coulter, Kalifornien, USA)
- HBSS (Gibco life technologies, Darmstadt, Deutschland)
- LPS Escherichia coli 0111:B4 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- eisgekühltes Methanol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- 0,1 molares Natriumhydroxid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Szintillations-Lösung Rotiszint® eco plus (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Trichloressigsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Kultur- und Versuchsmedien wie in Abschnitt 2.1 beziehungsweise 2.3 beschrieben.

Eine weitere Möglichkeit, die Proliferationszunahme der Zellreihen unter LPS-Inkubation nachzuweisen, ist die Messung des radioaktiven Zerfalls nach dem Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA.

Für diesen Versuchsaufbau mit der Zellreihe A549 wurden je Zeitwert 24 Wells einer 48-Well-Platte mit je 20 000 Zellen in 500 μL Kulturmedium ausgesät. Nach 24 Stunden der Inkubation bei 37 °C und 5% CO_2 erfolgte ein Mediumwechsel. Hierzu wurden die Überstände abgesaugt und jedes Well wurde etwa mit 500 μl DPBS gespült. Nach erneuter Absaugung wurden 500 μl eines Mediums ohne FCS zugegeben. Nach erneuter Inkubation für 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel zu dem 1% FCS-haltigen Versuchsmedium durchgeführt. In diesem Versuchsmedium wurden die LPS-Konzentrationen 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 1 $\mu\text{g/mL}$ und 10 $\mu\text{g/mL}$ verdünnt. Hiernach wurden je 6 Wells mit den verschiedenen LPS-Konzentrationen in je 500 μl Versuchsmedium inkubiert. 6 Wells wurden als Kontrolle mit 500 μl Versuchsmedium ohne LPS gewählt. Während der Inkubationszeiten von 8 und 24 Stunden erfolgte die Beimischung von ^3H -Thymidin jeweils 4 Stunden vor Ablauf der Inkubationszeit.

Daraufhin wurden die Zellen zwei Mal mit 500 μl HBSS gewaschen, anschließend mit 250 μl eisgekühltem Methanol fixiert und mit 250 μl Trichloressigsäure ausgefällt.

Abschließend wurden die Proben in 0,1 molarem Natriumhydroxid lysiert, in 4 ml Szintillations-Lösung gegeben und mit dem beta-Zähler gemessen.

2.7 Zellzahlmessung unter pharmakologischer Inhibition von COX-Isoformen und COX-Metaboliten

Benötigte Materialien, Substanzen und Geräte:

- 24-Well-Platten Cellstar (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Antagonisten: Indomethacin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
NS-398 (Calbiochem Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
AH-6809 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA)
- CasyR Modell TT 150 µm Kapillardurchmesser (Innovatis AG, Reutlingen, Deutschland)
- DPBS (PAN BioTech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- LPS Escherichia coli 0111:B4 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Stopp-Solution (80 % DPBS + 20 % FCS)

Kultur- und Versuchsmedien wie in Abschnitt 2.1 beziehungsweise 2.3 beschrieben.

Um einen besseren Einblick in die Stoffwechselwege der Proliferationszunahme bei Inkubation mit LPS bei den verwendeten Zellreihen (A549, H1299 und H226) zu bekommen, wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau durchgeführt, wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, jedoch mit zusätzlicher Inkubation mit verschiedenen Antagonisten und Inhibitoren. Ausgesät wurden je 15 000 Zellen/500 µl Kulturmedium auf eine sterile 24-Well-Platte. Für jeden Antagonisten und die Kontrollwerte ohne Antagonisten wurde jeweils eine neue Platte verwendet. Die Inkubationszeiten im Kulturmedium sowie die Zugabe von LPS entsprechen den Angaben in Abschnitt 2.3, bei H226 wurden nur die LPS-Konzentrationen 0,1 µg/ml und 1 µg/ml LPS verwendet, da nur unter diesen Bedingungen zuvor eine Proliferationszunahme gemessen werden konnte.

Im nächsten Schritt wurde jede Platte mit einem der Antagonisten/Inhibitoren oder mit dem Versuchsmedium ohne LPS inkubiert. Somit wurde jedem der acht (bzw. sechs bei H226) Wells, die auf jeder Platte Zellen enthielten, 55 µl Versuchsmedium ohne LPS (für die Kontrollplatte) oder 55 µl Versuchsmedium, in dem der jeweilige Antagonist oder Inhibitor verdünnt war, zugegeben. Welche Konzentration der Antagonisten und Inhibitoren bei den entsprechenden Zellreihen vorlag und welche Aufgabe diese übernehmen, zeigt Tabelle 5.

Antagonist/ Inhibitor	Selektivität	A549 - C in μM	H1299 - C in μM	H226 - C in μM
Indomethacin	unselektiver COX-Inhibitor	10	10	25
NS-398	selektiver COX-2-Inhibitor	10	10	25
AH-6809	EP-Antagonist (EP1-EP3)	10	10	10

Tabelle 5: Endkonzentrationen (C) der COX-Inhibitoren im Well und des EP-Antagonisten und deren Selektivität

Nach einer weiteren Inkubationsphase von 24 Stunden wurden die Platten mit dem CasyR Modell TT gemessen. Die Vorbereitung und Durchführung der Messung wurde bereits unter Abschnitt 2.3 beschrieben. Auch bei diesem Versuchsaufbau wurde eine Referenz, bestehend aus vier Wells mit 15 000 Zellen/500 μl Kulturmedium, ausgesät und am Tag der Inkubation mit LPS und den Antagonisten gemessen. Diese Referenz wurde allen Messwerten abgezogen.

2.8 Prostaglandin E₂ und Thromboxan A₂ Bestimmung mittels ELISA

Benötigte Materialien, Substanzen und Geräte:

- 24-Well-Platten Cellstar (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Arachidonsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- DPBS (PAN BioTech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- LPS Escherichia coli 0111:B4 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Prostaglandin E₂ EIA Kit - Monoclonal (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA)
- Medium für die Inkubation mit Arachidonsäure ohne FCS für A549 und H226
 - 98 % DMEM-F12 (Gibco life technologies, Darmstadt, Deutschland)
 - 1 % Glutamin 200 mM (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
 - 1 % Penicillin/Streptomycin: 10 000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin (PAN BioTech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- Medium für die Inkubation mit Arachidonsäure ohne FCS für H1299
 - 1 % Penicillin/Streptomycin: 10 000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin (PAN BioTech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
 - 99 % RPMI 1640 (PAN BioTech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- Reader ELx808 Absorbance Microplate Reader (BioTek, Bad Friedrichshall)
- Reagiergefäß 1,5 ml (Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, Deutschland)
- Rüttler IKA VeBrax-VXR (Janke und Kunkel, Staufenberg i.Br., Deutschland)
- Thromboxane B₂ EIA Kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA)
- Zentrifuge Mikro 22R (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)

Kultur- und Versuchsmedien wie in Abschnitt 2.1 beziehungsweise 2.3 beschrieben.

Der Versuchsaufbau für die Bestimmung von Thromboxan A₂ sowie Prostaglandin E₂ beinhaltete eine Zellaussaat von je 50 000 Zellen/500 µl Kulturmedium der Zellreihe A549 in 8 Wells einer sterilen 24-Well-Platte. Nach einer Inkubationsphase von 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel zu einem 1 % FCS-haltigen Versuchsmedium durchgeführt. Hierzu wurde jedes Well abgesaugt, mit etwa 500 µl DPBS gewaschen und dies erneut abgesaugt. Im Vorfeld wurde LPS im Versuchsmedium verdünnt, sodass die Konzentrationen 1 µg/ml und 10 µg/ml LPS vorlagen. Eingesetzt wurden diese Konzentrationen wie in Tabelle 6 dargestellt.

	ohne LPS ohne AA	ohne LPS mit AA	1 µg/ml LPS mit AA	10 µg/ml LPS mit AA	
	ohne LPS ohne LPS	ohne LPS mit AA	1 µg/ml LPS mit AA	10 µg/ml LPS mit AA	

Tabelle 6: Plattenaufteilung für die Gewinnung der Zellüberstände zur Quantifizierung von Thromboxan A₂ und Prostaglandin E₂

Jedes Kästchen entspricht einem Well.

Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden mit den jeweiligen LPS-Konzentrationen und 1%igem FCS Medium wurden ein Mediumwechsel und die Zugabe von Arachidonsäure (AA) durchgeführt. Hierzu wurden die Überstände abgesaugt, jedes Well zwei Mal mit DPBS gewaschen und im Anschluss mit 500 µl Medium ohne FCS befüllt. In einige Wells (Tabelle 6) wurden 55 µl der verdünnten AA hinzugegeben, sodass die Endkonzentration im Well 2,5 µM AA betrug. In die Wells ohne AA wurden 55 µl des Mediums ohne FCS zugegeben. Es erfolgte erneut eine Inkubation für 12 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator.

Daraufhin wurden 500 µl jedes Wells in ein 1,5 ml Reagiergefäß (Cup) gegeben und bei 14000×g zentrifugiert, um eine Kontamination des ELISA mit Zellbestandteilen zu verhindern. Von jedem Cup wurden 120 µl Überstand in drei Cups pipettiert und bei -20°C bis zur ELISA-Messung eingefroren.

Der eigentlich aktive Metabolit im humanen Thromboxan-Stoffwechsel ist Thromboxan A₂ (TxA₂), dies wird allerdings schon nach einigen Sekunden zum inaktiven und über längere Zeit nachweisbaren TxB₂ umgebaut⁸¹, welches im ELISA quantifiziert wird und dessen Konzentration direkt proportional zum TxA₂ ist. Zur ELISA-Messung wurden die entsprechenden Proben aufgetaut und mit Hilfe des Rüttlers durchmischt. Die Prinzipien des TxB₂ und des PGE₂ ELISA sind identisch. An die polyklonalen anti-Maus IgG, welche am Boden aller Wells fixiert sind, bindet der spezifische Antikörper für TxB₂ oder PGE₂. TxB₂ oder PGE₂ bindet an den jeweiligen Antikörper. An die freien Bindungsstellen bindet zusammen mit dem spezifischen Antikörper der Tracer (Acetylcholinesterasen gekoppelt mit TxB₂ oder PGE₂).

Nachdem der Blank, die totale Aktivität, die nicht-spezifische Bindung, die maximale Bindung, die Standards (alle Standards verdünnt in DMEM-F12-Medium ohne FCS) und die Proben in die jeweiligen Wells pipettiert wurden und der Tracer und die Antikörper zugegeben wurden, kam es zu einer Inkubationszeit von 18 Stunden. Nach dieser Inkubation des PGE₂ ELISA bei 4 °C und des TxB₂ ELISA bei Raumtemperatur wurde nach 5-maligem Waschen mit dem entsprechenden Waschpuffer Ellman's Reagent, welches das Substrat für die Acetylcholinesterase enthält, zugegeben. Das gelbe Produkt dieser enzymatischen Reaktion wurde nach etwa 60 Minuten bei 412 nm im Reader gemessen. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Bindung des Tracers und umgekehrt proportional zur Bindung von freiem TxB₂ bzw. PGE₂.

2.9 Messung der Prostaglandinrezeptor-Expressionsprofile mittels RT-PCR

Benötigte Materialien, Substanzen und Geräte:

- 6-Well-Platten Cellstar (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- DPBS (PAN BioTech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland)
- LPS Escherichia coli 0111:B4 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Lysispuffer Trizol Reagent (ambion life technologies, Darmstadt, Deutschland)
- Mx3000P Real-Time PCR System (Stratagene, La Jolla, USA)
- Platinum SYBRGreen qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen life technologies, Darmstadt, Deutschland)
- Reagiergefäß 1,5 ml (Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, Deutschland)

Kultur- und Versuchsmedien wie in Abschnitt 2.1 beziehungsweise 2.3 beschrieben.

Um die Rezeptorexpression der Prostaglandinrezeptoren in den verwendeten Zelllinien zu charakterisieren und den Einfluss von LPS auf die Prostaglandinrezeptor-Expression darzustellen, wurden Versuche mit Hilfe der Real Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt.

Für diesen Versuchsaufbau wurden je 150 000 Zellen/1,5 ml Kulturmedium in 6-Well-Platten ausgesät. Es wurden für jeden Messzeitpunkt zwei 6-Well-Platten benötigt, wovon alle Wells mit der Zelllösung befüllt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei den Zellreihen A549 und H1299 und 72 Stunden für die Zellreihe H226 erfolgte ein Mediumwechsel. Nach Absaugen des Überstandes, dem Spülen mit 1 ml DPBS pro Well und dem erneuten Absaugen wurden die Wells mit Versuchsmedium und der entsprechenden LPS-Konzentration erneut inkubiert. Es wurden alle LPS-Konzentrationen (0,1 µg/ml; 1 µg/ml und 10 µg/ml) vor dem Mediumwechsel im Versuchsmedium verdünnt. Nach 12 bzw. 24 Stunden wurden die Überstände abgesaugt und pro Well 200 µl des Lysispuffers Trizol zugegeben. Dieser Arbeitsschritt erfolgte unter einem Abzug in einem RNA-Labor. Der Inhalt jedes Wells wurde mit Hilfe eines Scrapers in ein 1,5 ml Reagiergefäß gefüllt. Alle Proben wurden bei -80°C bis zur Durchführung der PCR aufbewahrt.

Die Arbeitsschritte der RT-PCR wurde von der Arbeitsgruppe Savai durchgeführt und in einigen Veröffentlichungen beschrieben, an denen die Arbeitsgruppe Savai beteiligt war und sind an dieser Stelle nicht detailliert dargestellt.⁸²⁻⁸⁵

Als Referenzgen wurde das Enzym Porphobilinogen Deaminase (PDGD) verwendet, diese und alle weiteren Primer sind in Tabelle 7 dargestellt. Zur Interpretation der gemessenen Veränderungen der mRNA wurde die komparative $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewendet. Der C_t -Wert ist die Anzahl der Zyklen, die notwendig ist, damit sich das gemessene Gen gerade noch vom Hintergrundsignal unterscheidet (threshold cycle). ΔC_t berechnet sich anhand der Formel (C_t -Referenzgen - C_t -Zielgen) aus der selben DNA-Probe.⁸²⁻⁸⁵

Primer-Name	Länge [bp]	Sequenzen
EP1	151	forward 5' CTTGTCGGGTATCATGGTGGT 3'
		reverse 5' AAGGGTCCAGGATCTGGTT 3'
EP2	187	forward 5' CCTCATTCTCCTGGCTATCA 3'
		reverse 5' TCTCAGAACAGGAGGCCTAA 3'
EP3	169	forward 5' GAGACGGCCATTCAGCTTAT 3'
		reverse 5' CCAGGCGAACAGCTATTAAG 3'
EP4	160	forward 5' TCTTACTCATTGCCACCTCC 3'
		reverse 5' TCTAGGATGGGGTTCACAGA 3'
PBGD	213	forward 5' CAGGAGTCAGACTGTAGGACGAC 3'
		reverse 5' ACTCTCATCTTTGGGCTGTTTTTC 3'

Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotidprimer zur Durchführung der RT-PCR

Abgebildet sind alle Primer für die Prostaglandinrezeptoren (EP1-EP4) sowie der Primer des Referenzgens Porphobilinogen Deaminase (PBGD).

2.10 VEGF Bestimmung mittels ELISA

Benötigte Materialien, Substanzen und Geräte:

- 24-Well-Platten Cellstar (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- 96-Well-Platten Cellstar (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- DPBS (PAN BioTech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- Human VEGF Duo Set (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)
 - Capture Antikörper
 - Detection Antikörper
 - Standards
 - Streptavidin-HRP
- LPS Escherichia coli 0111:B4 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Reader ELx808 Absorbance Microplate Reader (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland)
- Reagent Diluent Concentrate (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)
- Reagiergefäß 1,5 ml (Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, Deutschland)
- Rüttler IKA VeBrax-VXR (Janke und Kunkel, Staufenberg i.Br., Deutschland)
- 1 molare Schwefelsäure (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- TMB Substrate Reagent Set (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland)
- Tween 20 (Invitrogen life technologies, Darmstadt, Deutschland)
- Zentrifuge Mikro 22R (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)

Kultur- und Versuchsmedien wie in Abschnitt 2.1 beziehungsweise 2.3 beschrieben.

Die Funktionsweise dieses ELISA ist ähnlich der für PGE_2 und TxB_2 , wie in Abschnitt 2.8 bereits kurz beschrieben. Für diese Versuche wurden von jeder Zellreihe (A549, H1299, H226) jeweils 50 000 Zellen/500 μl Kulturmedium in eine 24-Well-Platte ausgesät. Bei den Zellreihen A549 und H1299 wurde nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und 5 % CO_2 ein Wechsel des Mediums zum Versuchsmedium ohne LPS und 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS durchgeführt. Bei der Zellreihe H226 erfolgte dieser Wechsel zum Versuchsmedium, hier ohne LPS und mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS, nach 72 Stunden. Weiterhin wurden allen Zellreihen, wie aus Tabelle 8 ersichtlich, 55 μl Versuchsmedium oder

55 µl EP-Antagonist (Endkonzentration im Well 10 µM) zugegeben. Es wurden pro Ansatz Doppelwerte bestimmt.

	Kontrolle	mit LPS ohne EP-A	ohne LPS mit EP-A	mit LPS mit EP-A	
	Kontrolle	mit LPS ohne EP-A	ohne LPS mit EP-A	mit LPS mit EP-A	

Tabelle 8: Plattenaufteilung für VEGF ELISA

Jedes Kästchen entspricht einem Well.

Für A549 und H1299 wurden jeweils 10 µg/ml LPS und für H226 1 µg/ml LPS verwendet. Die Endkonzentration des Prostaglandinrezeptorantagonisten (EP-A) betrug 10 µM.

Nach einer weiteren Inkubation mit dem Versuchsmedium, LPS und dem EP-Antagonisten wurden 500 µl Überstand jedes Wells in ein 1,5 ml Reagiergefäß (Cup) gegeben und bei 250×g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die zentrifugierten Überstände zu je 120 µl in drei Cups aufgeteilt und bei -20 °C bis zur Durchführung des ELISA eingefroren.

Für die Durchführung des VEGF ELISA wurde am Tag vor der eigentlichen Messung die 96-Well-Platte mit dem Capture Antikörper befüllt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden alle Proben aufgetaut und mit Hilfe des Rüttlers durchmischt, es wurde der Wasch-Puffer aus DPBS und Tween hergestellt, sowie Reagent Diluent und alle Standards entsprechend des verwendeten Protokolls verdünnt. Nachdem die Platte entleert und jedes Well dreimalig gewaschen wurde, erfolgte eine Inkubation mit 300 µl Reagent Diluent für 1 Stunde.

Im Anschluss wurden, nach erneutem Waschen, die Standards und die Proben zu je 100 µl in die Wells gegeben und für zwei Stunden inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde für weitere zwei Stunden 100 µl des Detection Antikörpers in jedes Well gegeben. Hierauf folgte jeweils nach einem Waschschrift eine 20-minütige Inkubation mit 100 µl Streptavidin-HRP und mit 100 µl der Substat-Lösung. Abschließend wurden jedem Well 50 µl 1 molare Schwefelsäure zugegeben und die Platte wurde im ELISA Microplate Reader bei 450 nm und 630 nm gemessen und ausgewertet.

2.11 Statistische Auswertung

Alle erhobenen Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (sem). Die Prüfung auf statistische Signifikanz erfolgte bei allen Versuchsaufbauten mittels Varianzanalyse (oneway-ANOVA) und darauf folgendem Tukey's honestly significant difference Test.

3. Ergebnisse

3.1 Überblick

Zu Beginn der Versuchsdurchführungen im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Lungenkarzinomzelllinien mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen inkubiert, um die Wirkung von LPS auf das Proliferationsverhalten der Zellen zu untersuchen.

Die Messung der Zellproliferation erfolgte mit vier unterschiedlichen Verfahren, welche im Folgenden kurz beschrieben werden sollen. Am Anfang stand die quantitative Zellzahlmessung mittels automatisierter Zellzählung (CasyR Modell TT), darauf folgte die Messung der mitochondrialen Stoffwechselaktivität durch den MTS-Assay. Schließlich wurde die Proliferationszunahme auf DNA-Ebene mittels des Einbaus des Pyrimidinanalogs BrdU sowie der markierten Base ^3H -Thymidin quantifiziert.

Um den Stoffwechselweg dieser LPS-abhängigen Proliferationszunahme genauer zu beleuchten, wurde nach Bewertung der bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführten Versuche und erhobenen Daten die quantitative Zellzahlmessung als das geeignetste Verfahren erachtet, um weitere Versuche durchzuführen.

Für die pharmakologischen Inhibitionsversuche kamen jeweils die Bedingungen zum Einsatz unter denen LPS zuvor den größten sichtbaren Effekt hatte (24 Stunden Messzeitpunkt; LPS-Konzentrationen 1 $\mu\text{g/ml}$, bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ je nach Zelllinie). Durch Zugabe verschiedener Enzyminhibitoren und Rezeptorantagonisten sollten zunächst der COX-Stoffwechselweg unselektiv (Pan-COX-Inhibitor) und selektiv (COX-2-Inhibitor) gehemmt werden. Darauf wurden die Stoffwechselprodukte Thromboxan B_2 und Prostaglandin E_2 quantifiziert, um zu untersuchen, ob diese Produkte nach LPS-Stimulation von der Tumorzelle sezerniert werden. Da lediglich PGE_2 in messbaren Mengen sezerniert wurde, fokussierten wir uns im Folgenden auf diesen Mediator und die Rolle der EP-Rezeptoren bei der LPS-induzierten Tumorzellproliferation. Um zunächst zu charakterisieren, ob EP-Rezeptoren überhaupt auf den verwendeten Tumorzelllinien exprimiert werden und möglicherweise sogar durch Endotoxin eine Hochregulation erfahren, wurden daraufhin mittels RT-PCR Expressionsprofile dieser Rezeptoren unter LPS-Inkubation gemessen. Hierbei zeigte sich, dass alle EP-Rezeptoren an allen drei Zelllinien exprimiert waren. Unter Endotoxin-Stimulation erfolgte eine leichte Hochregulation der EP1-EP3 an den Adenokarzinomzelllinien.

Daraufhin wurde ein breiter EP-Antagonist mit Spezifität für EP1, EP2 und EP3 eingesetzt, um die Rolle der EP-Rezeptoren in der LPS-vermittelten NSCLC-Zellproliferation zu definieren.

Abschliessend wurde untersucht, ob die LPS-Stimulation auch zu einer Synthese des pro-angiogenen Faktors VEGF führt und ob die Aktivierung von EP-Rezeptoren hierbei eine Rolle spielt.

3.2 Untersuchungen zum Effekt von LPS auf die Proliferation von NSCLC-Zelllinien anhand der Zellzahlmessung

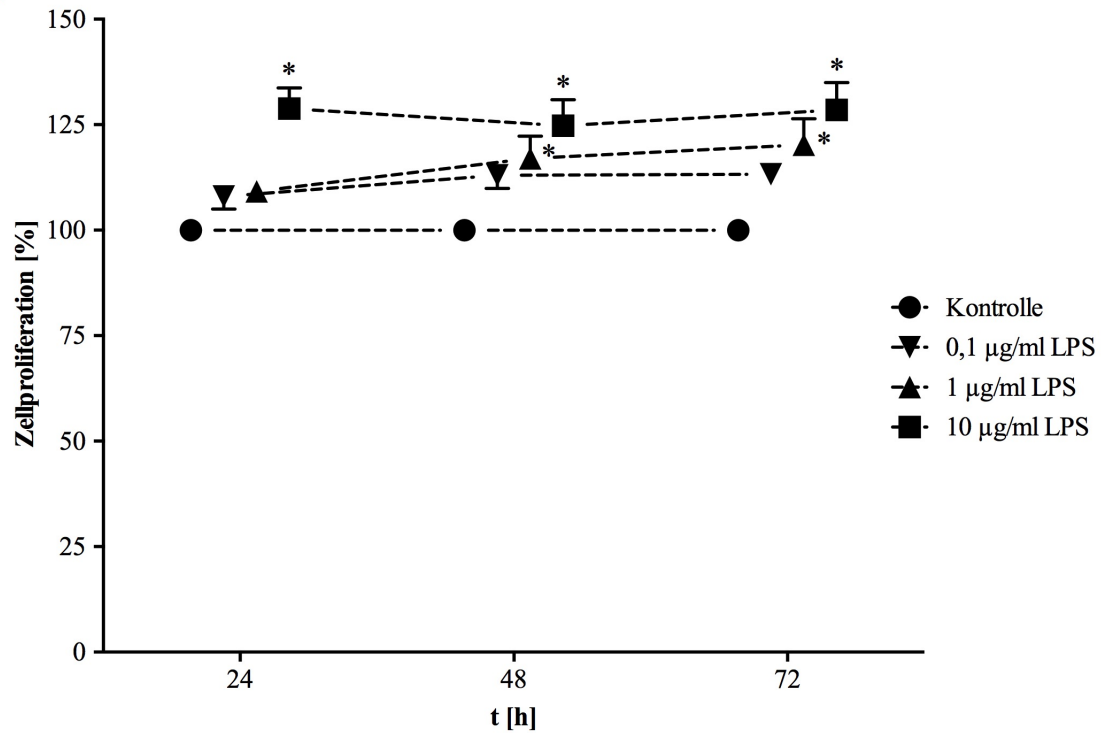
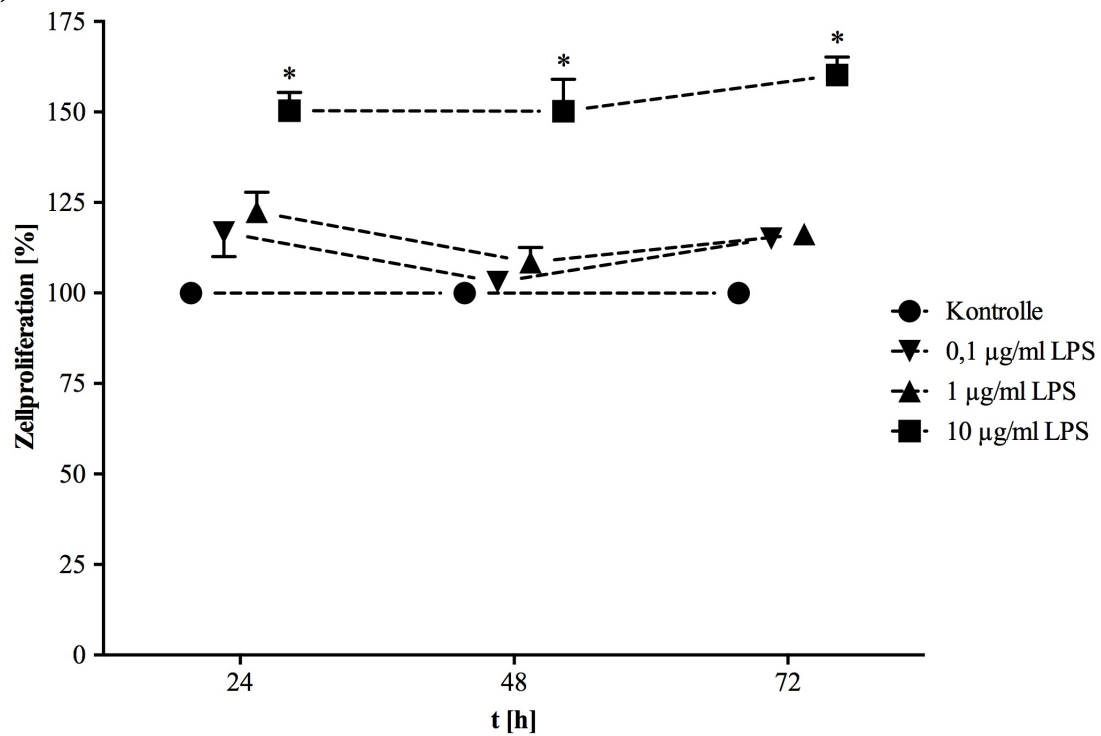
Zu Beginn der Untersuchungen wurde jede Zellreihe mit drei verschiedenen Konzentrationen LPS (0,1 µg/ml; 1 µg/ml; 10 µg/ml) stimuliert, die Proliferation wurde je nach Versuchsaufbau und Testverfahren zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Mithilfe der Zellzahlmessung im Messgerät CasyR Modell TT wurde nach 24, 48 und 72 Stunden die zelluläre Proliferation gemessen. Um interindividuelle Schwankungen zwischen den Versuchen auszugleichen, wurde jeweils die gemessene Zellzahl in unstimulierten Zellen als Kontrolle definiert, und die in LPS stimulierten Zellen gemessene Zellzahl prozentual zu dieser Kontrolle ausgedrückt, wobei die Kontrolle als 100 Prozent definiert wurde. Alle drei Zellreihen zeigten eine Proliferationszunahme unter Zugabe von LPS. Jedoch wiesen die verschiedenen Zelllinien Unterschiede hinsichtlich der Dosisabhängigkeit des Effektes von LPS auf.

In der Adenokarzinomzellreihe A549 zeigte sich bereits 24 Stunden nach Stimulation mit 10 µg/ml LPS die maximale Proliferationszunahme. In der unstimulierten Kontrolle waren 34526 ± 1973 Zellen vorhanden, dieser Wert wurde als 100 % definiert. Nach Stimulation mit 10 µg/ml LPS konnte eine Zellzahlzunahme auf 128,8 % verzeichnet werden. Die Messungen nach 24 und 72 Stunden nach Stimulation mit 10 µg/ml LPS zeigten ebenfalls eine signifikante Proliferationszunahme auf ähnlich hohem Niveau (Abbildung 5a). Der Effekt von LPS war dosisabhängig. Zwar war auch nach Stimulation mit niedrigeren Konzentrationen von LPS (0,1 µg/ml und 1 µg/ml) eine Zunahme der Proliferation zu verzeichnen, die aber im Vergleich zu den Effekten von 10 µg/ml LPS weniger stark ausgeprägt war und sich bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden noch nicht signifikant von der Kontrolle unterschied. Nach 48 und auch nach 72 Stunden konnte durch Stimulation mit 1 µg/ml LPS eine signifikante Zunahme der Proliferation gezeigt werden, während 0,1 µg/ml LPS diesbezüglich keinen signifikanten Effekt hatten (Abbildung 5a).

Die LPS-induzierte Proliferationszunahme der NSCLC-Adenokarzinomzelllinie H1299 wies einen ähnlichen zeitlichen Verlauf auf, welcher jedoch unter 10 µg/ml LPS etwas stärker ausgeprägt war. In der unstimulierten Kontrolle waren nach 24-stündiger Inkubation 12345 ± 1281 Zellen vorhanden. Dieser Wert wurde als 100 % definiert. Die Zellzahl stieg in dieser Zeitperiode nach Inkubation mit 10 µg/ml LPS auf 150,4 % der

Kontrolle. Während die LPS-induzierte Proliferationssteigerung nach 48 Stunden nahezu identisch war, ließ sich nach 72 Stunden ein weiterer Proliferationsanstieg auf 160,3 % im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu diesem Zeitpunkt verzeichnen (Abbildung 5b). Wurde LPS in niedrigeren Konzentrationen (0,1 µg/ml und 1 µg/ml) eingesetzt, ließ sich ebenfalls eine Zunahme der zellulären Proliferation verzeichnen, die nach 24 Stunden am stärksten ausgeprägt war. Ein statistisch signifikanter Unterschied zur unstimulierten Kontrolle ließ sich jedoch bei diesen LPS-Konzentrationen nicht nachweisen (Abbildung 5b).

Die Plattenepithelkarzinomzelllinie H226 verhielt sich unter Stimulation mit LPS anders als die vorher beschriebenen Zellreihen. Die höchste Proliferationszunahme wurde bereits bei 1 µg/ml LPS erreicht, höhere Konzentrationen von LPS konnten diesen Effekt nicht hervorrufen. Die 24 Stunden-Messwerte zeigten für die unstimulierten Kontrollen 35 433 Zellen \pm 2393 (100 %). Nach Stimulation mit 1 µg/ml LPS konnte eine Steigerung der Proliferation auf 133,4% verzeichnet werden (Abbildung 5c). Die Inkubation mit der niedrigeren LPS-Konzentration (0,1 µg/ml) führte nach 24 Stunden zu einer etwas geringer ausgeprägteren Proliferationszunahme gegenüber der Kontrolle, während die Stimulation mit 10 µg/ml LPS die Proliferation an dieser Zelllinie nicht steigern konnte. Wurde die Inkubation mit LPS über 48 bzw. 72 Stunden fortgeführt, lag die Zellzahl der LPS-stimulierten Proben tendenziell etwa bei 110 % - 120 % der unstimulierten Kontrolle (Abbildung 5c).

a) A549**b) H1299**

c) H226

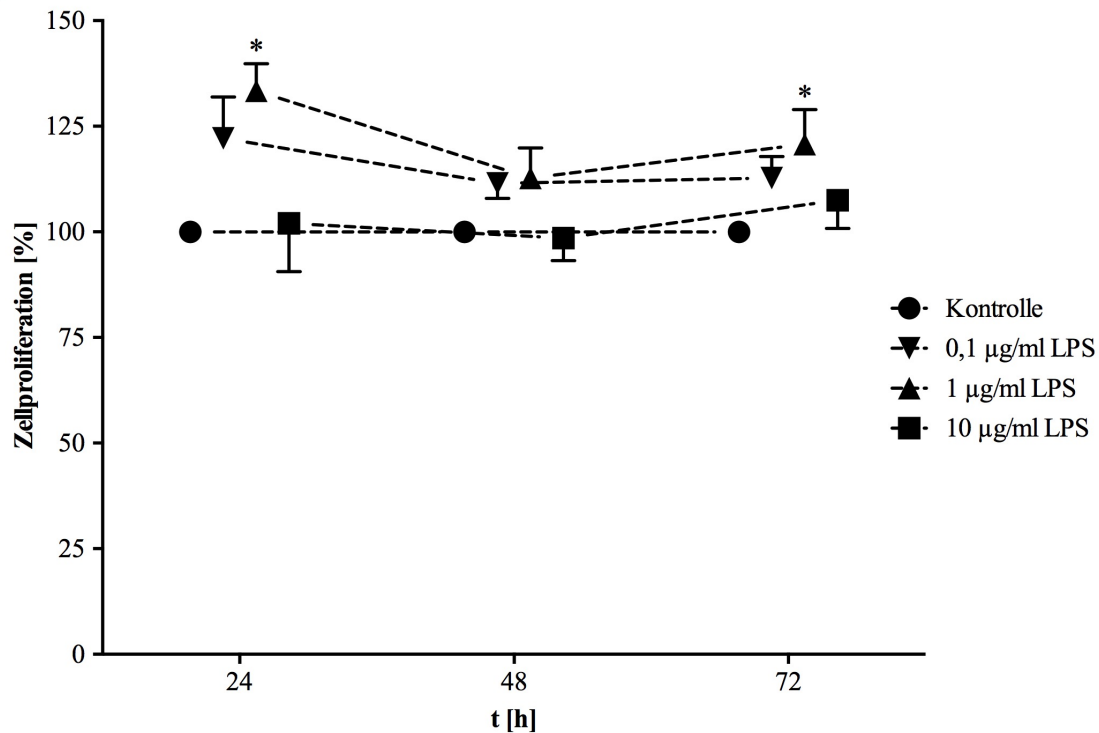


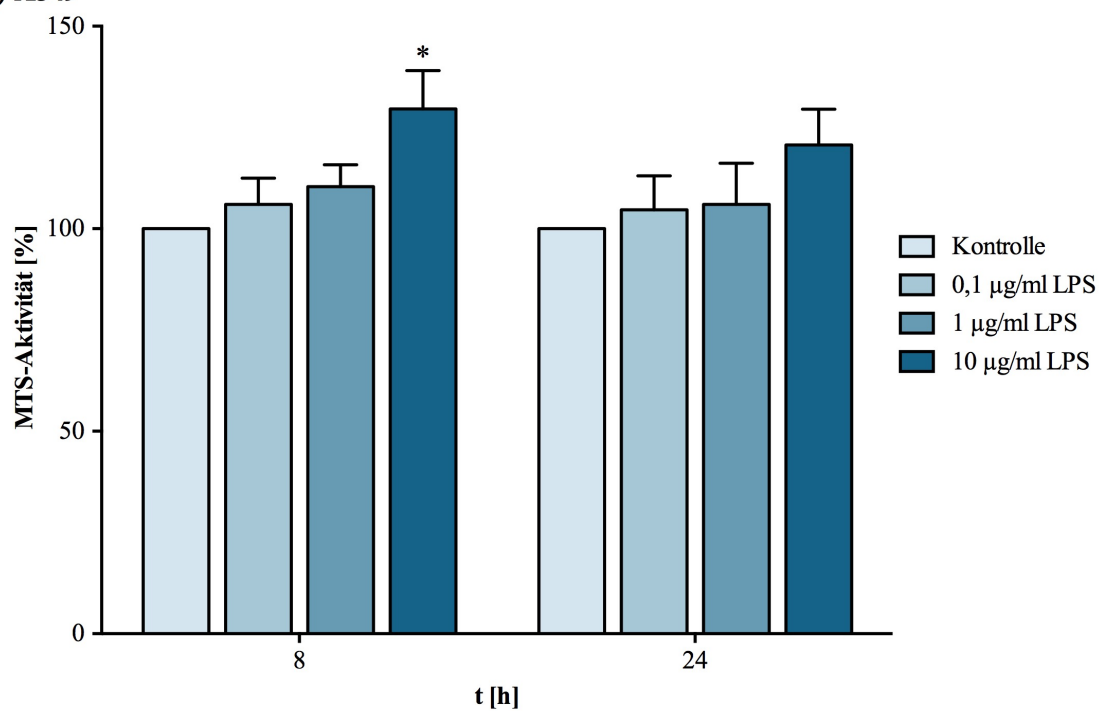
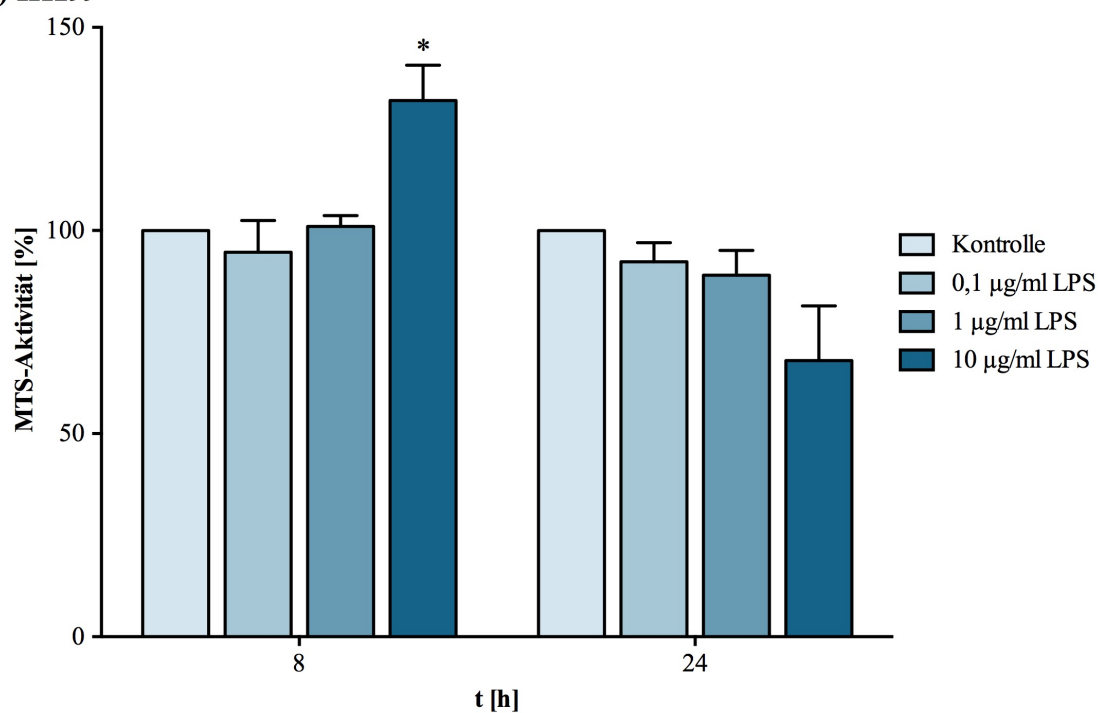
Abbildung 5: Messung der Proliferationszunahme unter Stimulation mit LPS durch automatisierte Zellzählung

Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von LPS inkubiert und die Zellzahl durch automatisierte Zellzählung im Casy Cell Counter quantifiziert. Die Zellzahl ist als Prozentwert bezogen auf die unstimulierte Kontrolle abgebildet. Messwerte, welche mit * gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant von der jeweiligen Kontrolle (*= $p < 0,05$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von mindestens vier unabhängigen Experimenten.

3.3 Untersuchungen zum Effekt von LPS auf die Zellproliferation mittels Quantifizierung der Stoffwechselaktivität (MTS-Assay)

Stoffwechselaktive Zellen können durch den MTS-Assay dargestellt werden. Diese metabolisieren das gelbe Substrat MTS zu lilafarbenem Formazan, welches im ELISA anhand der Messung des Farbumschlags quantifiziert werden kann. Für die Quantifizierung der Proliferation in diesem Assay wurden frühe Messzeitpunkte bei 8 und 24 Stunden gewählt, da es sehr wichtig war, zellteilungsaktive Phasen und somit Proliferationszunahmen durch Zugabe der MTS-Substanz darzustellen.

Bei allen drei Zelllinien konnte eine frühe Proliferationszunahme bereits bei 8 Stunden nachgewiesen werden (Abbildung 6). Bei A549 und H1299 stieg die Proliferationszunahme bei 10 µg/ml LPS mit signifikantem Unterschied zur unstimulierten Kontrolle (100 %) auf 129,6 % bzw. 132 % an (Abbildung 6a, b). Bei den Plattenepithelkarzinomzellen H226 konnte erneut die maximale Proliferation durch Stimulation mit 1 µg/ml LPS erzielt werden. Die Proliferation stieg zwar im Vergleich zu den Adenokarzinomzelllinien in etwas geringerem Ausmaß auf 110,2 % der unstimulierten Kontrolle an; dieser Anstieg unterschied sich dennoch signifikant von der unstimulierten Kontrolle. Die Zellreihe A549 zeigte auch nach 24-stündiger Inkubation eine dosisabhängige Steigerung der Proliferation unter Stimulation mit Endotoxin. Für die Zellreihen H1299 und auch H226 konnte zu diesem Messzeitpunkt keine Proliferationszunahme mehr verzeichnet werden.

a) A549**b) H1299**

c) H226

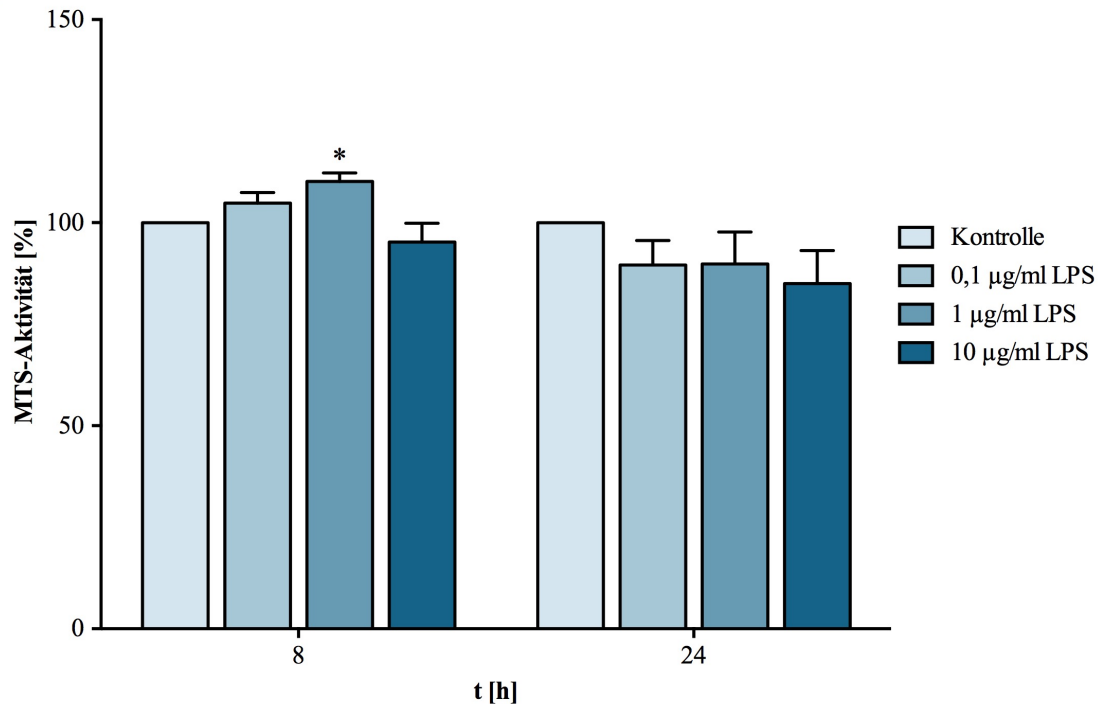


Abbildung 6: Messung der Proliferationszunahme unter Stimulation mit LPS mittels MTS-Assay

Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von LPS über die angegebenen Zeitperioden inkubiert. 2,5 Stunden vor Ende der Inkubationszeit wurde das Substrat MTS zupipettiert und der Farbumschlag im ELISA-Reader bei 490 nm quantifiziert. Angegeben ist die prozentuale Änderung der Proliferation bezogen auf die jeweilige Kontrolle nach Abzug des Blanks. Messwerte, welche mit * gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle (*= $p < 0,05$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus mindest vier unabhängigen Experimenten.

3.4 Untersuchungen zum Effekt von LPS auf die Proliferation von NSCLC-Zelllinien auf Ebene des Baseneinbaus in die DNA (BrdU ELISA und ³H-Thymidin-Assay)

Abschliessend wurde versucht, die zuvor gemachten Beobachtungen einer zeit- und dosisabhängigen Proliferationssteigerung auch auf DNA-Ebene darzustellen. Hierfür kamen der BrdU Zellproliferations ELISA und der ³H-Thymidin-Assay exemplarisch an der Zelllinie A549 zur Anwendung. Beide Substanzen sollen anstelle der DNA-Base Thymidin eingebaut werden und können über verschiedene Messmethoden einen Rückschluss auf die Zellzahl geben. Obwohl beide Verfahren auf molekularer Ebene ein ähnliches Nachweisprinzip verfolgen, einerseits durch Einbau von 5-Brom-2'-Deoxyuridin (BrdU), einem Pyrimidinanalogon, und andererseits durch den Einbau von ³H-Thymidin, um die Neusynthese von DNA nachzuweisen, zeigten sich Abhängigkeiten der LPS-Konzentrationen zur Zellzahlzunahme, die sich zeitlich unterschieden.

Während im 8 Stunden-Messwert des BrdU ELISA sich noch keine Proliferationszunahme unter LPS-Stimulation zeigt, lässt sich ein signifikanter Anstieg des Uridineinbau für den 24 Stunden-Messwert bei 10 µg/ml LPS auf 111,5% zeigen (Abbildung 7). Ein anderer Verlauf wurde für A549 mithilfe des Thymidin-Assays ermittelt. Hier konnte bereits beim 8 Stunden-Messwert ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle gezeigt werden, die Kernzerfälle/Minute stiegen hier auf 123 % bei 10 µg/ml LPS an. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden konnte keine Proliferationszunahme mit dieser Methode nachgewiesen werden (Abbildung 8).

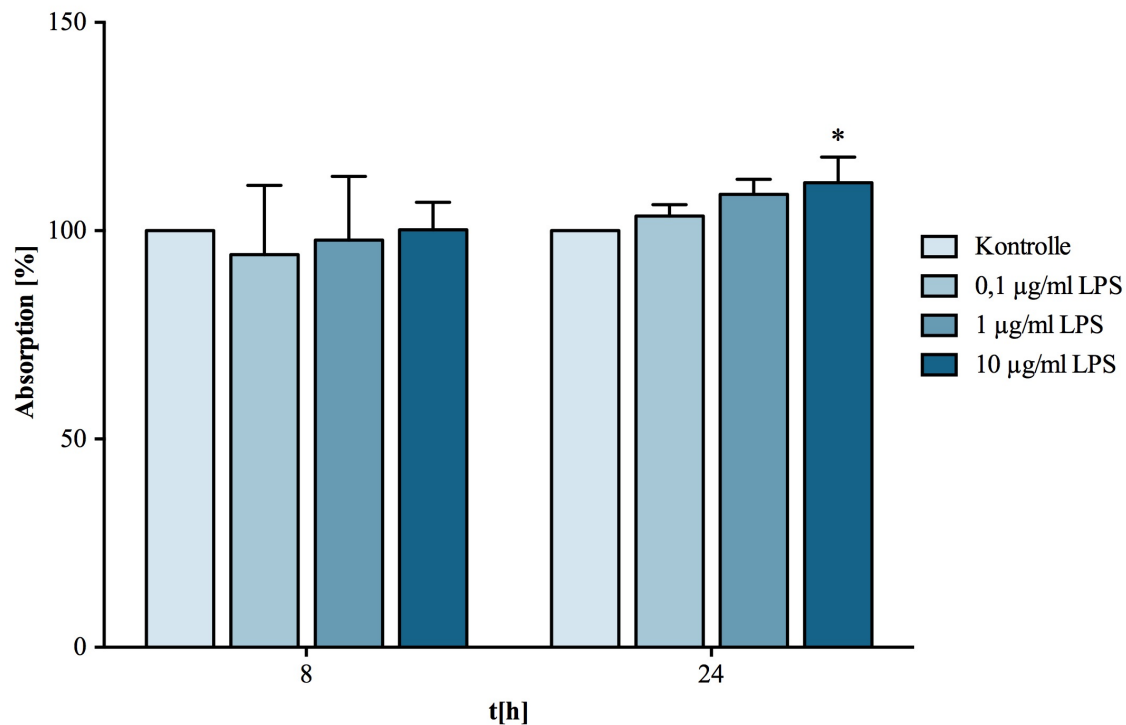


Abbildung 7: Messung der Proliferationszunahme für die Zelllinie A549 unter Stimulation mit LPS mittels BrdU ELISA

Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von LPS in Anwesenheit des Substrates BrdU über die angegebenen Zeitperioden inkubiert. Die Proliferationszunahme wurde mittels ELISA gemessen und wurde prozentual in Bezug auf die jeweilige Kontrolle ohne LPS berechnet. Messwerte, welche mit * gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant von der jeweiligen Kontrolle (*= $p < 0,05$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus mindestens vier unabhängigen Experimenten.

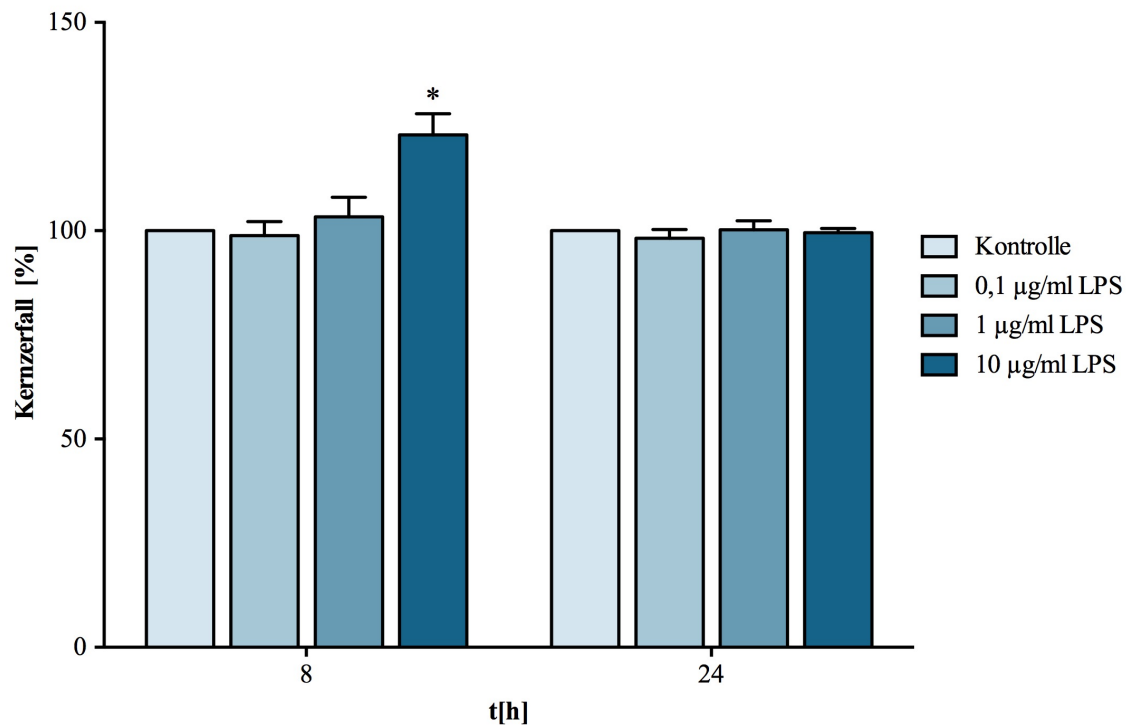


Abbildung 8: Messung der Proliferationszunahme für die Zelllinie A549 unter Stimulation mit LPS mittels ^3H -Thymidin-Assay

Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von LPS über die angegebenen Zeitperioden inkubiert. Vier Stunden vor Ablauf der Inkubationszeit wurde ^3H -Thymidin zugegeben und der Einbau nach Ablauf der Inkubationszeit im beta-Counter bestimmt. Dargestellt sind die gemessenen Kernzerfälle in einer Minute, die prozentual in Bezug auf die jeweilige Kontrolle ausgedrückt sind. Messwerte, welche mit * gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant von der jeweiligen Kontrolle ($*=p<0,05$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von mindest vier unabhängigen Versuchen..

3.5 Effekt von Inhibitoren des COX-Stoffwechsels auf die LPS-induzierte Zellproliferation

In den zuvor durchgeführten Experimenten wurde die Zellproliferation mit vier verschiedenen Methoden erfasst. Da die automatisierte Zellzählung als einzige Methode einen direkten Nachweis der Zellproliferation darstellt und zudem die Ergebnisse dieser Messmethode der geringsten Schwankungsbreite unterlagen, wurden diese Methode für alle weiteren Versuche zum Nachweis der Zellproliferation herangezogen.

Da der Cyclooxygenase eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des NSCLC zukommt, und unsere Voruntersuchungen zumindest für die Zelllinie A549 eine Rolle der COX bei der LPS-induzierten Zellproliferation in den Lungenkarzinomzellen nahelegten, sollte die Rolle der COX-2 in der LPS-induzierten Zellproliferation an allen drei Zelllinien überprüft werden.⁴² Als Enzyminhibitoren kamen der unselektive COX-Inhibitor Indomethacin sowie der selektive COX-2-Inhibitor NS-398 zum Einsatz.

In Vorversuchen wurden für diese Inhibitoren Konzentrationen ermittelt, die den Leerwert, also die basale Proliferation der Zellen in Abwesenheit von LPS, nicht beeinflussen, jedoch in der Literatur als inhibitorische Konzentration beschrieben sind (10 μ M Indomethacin bzw. NS-398 in A549 und H1299 Zellen, sowie 25 μ M Indomethacin und NS-398 in H226 Zellen^{41,86-89}). Für alle verwendeten Zelllinien erfolgte eine 24-stündige Inkubation mit LPS. Es wurde jeweils die LPS-Konzentration eingesetzt, die in den Zeit-Dosisreihen (Abschnitt 3.2) die maximale Proliferationssteigerung hervorrief (10 μ g/ml LPS bei den Zelllinien A549 und H1299 und 1 μ g/ml LPS bei der Zelllinie H226).

In A549-Zellen betrug die durch LPS hervorgerufene Proliferationssteigerung hier 137% bezogen auf die Kontrolle ohne LPS (100%). Diese Proliferationssteigerung konnte sowohl durch Indomethacin als auch durch den selektiven COX-2 Inhibitor NS-398 auf Kontrollniveau gehemmt werden, ohne dass diese Pharmaka die basale Proliferation beeinflussten (Abbildung 9a). Dieser Effekt des unselektiven COX- und selektiven COX-2-Inhibitors auf die LPS-induzierte Proliferationssteigerung ließ sich sowohl an H1299- als auch an H226-Zellen reproduzieren (Abbildung 9b, c).

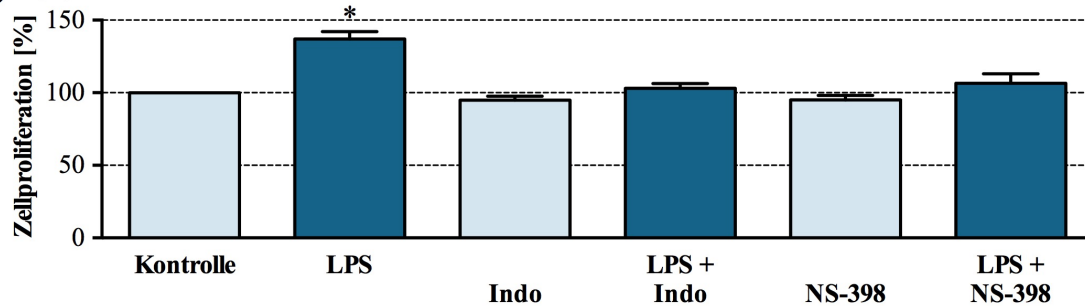
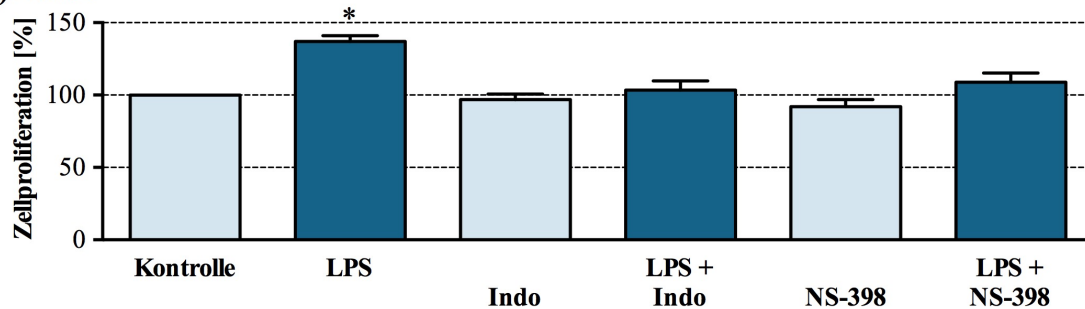
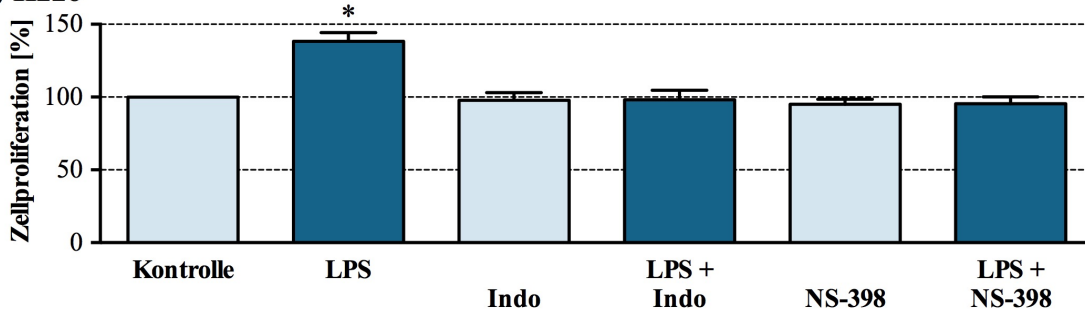
a) A549**b) H1299****c) H226**

Abbildung 9: Effekt von Cyclooxygenase-Inhibitoren auf die LPS-induzierte Proliferationssteigerung

Die Zellen wurden mit 10 µg/ml LPS (H226 mit 1 µg/ml LPS) oder Mediumkontrolle (Kontrolle) in Ab- oder Anwesenheit von Indomethacin (Indo, 10 µM bzw. 25 µM an H226) bzw. NS-398 (10 µM bzw. 25 µM an H226) für 24 Stunden inkubiert. Die Zellzahl wurde mittels automatisierter Zellzählung im Casy Cell Counter quantitativ gemessen und ist als Prozentwert gegenüber der Mediumkontrolle angegeben. Messwerte, welche mit * gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle (*= $p < 0,05$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus mindest fünf unabhängigen Versuchen.

3.6 Effekt von LPS auf die Freisetzung von Prostaglandin E_2 und Thromboxan A_2

Da gezeigt werden konnte, dass COX-Produkte eine zentrale Rolle bei der LPS-induzierten Zellproliferation spielen, sollte nun überprüft werden, ob auch eine Freisetzung der Metaboliten PGE_2 und TxA_2 in die Zellüberstände LPS-stimulierter NSCLC-Zelllinien zu verzeichnen war. Hierfür wurden die Zellen in Gegenwart des COX-Substrates Arachidonsäure ($2,5 \mu M$) in An- oder Abwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von LPS stimuliert und die PGE_2 -Sekretion mittels ELISA quantifiziert, wobei die testspezifische Nachweisgrenze bei 15 pg/ml lag. Dies wurde exemplarisch an A549-Zellen durchgeführt. Es zeigte sich ein moderater, dosisabhängiger Anstieg der PGE_2 -Sekretion nach 24-stündiger Inkubation mit LPS. (Abbildung 10). Ein Anstieg von Thromboxan A_2 konnte nicht verzeichnet werden.

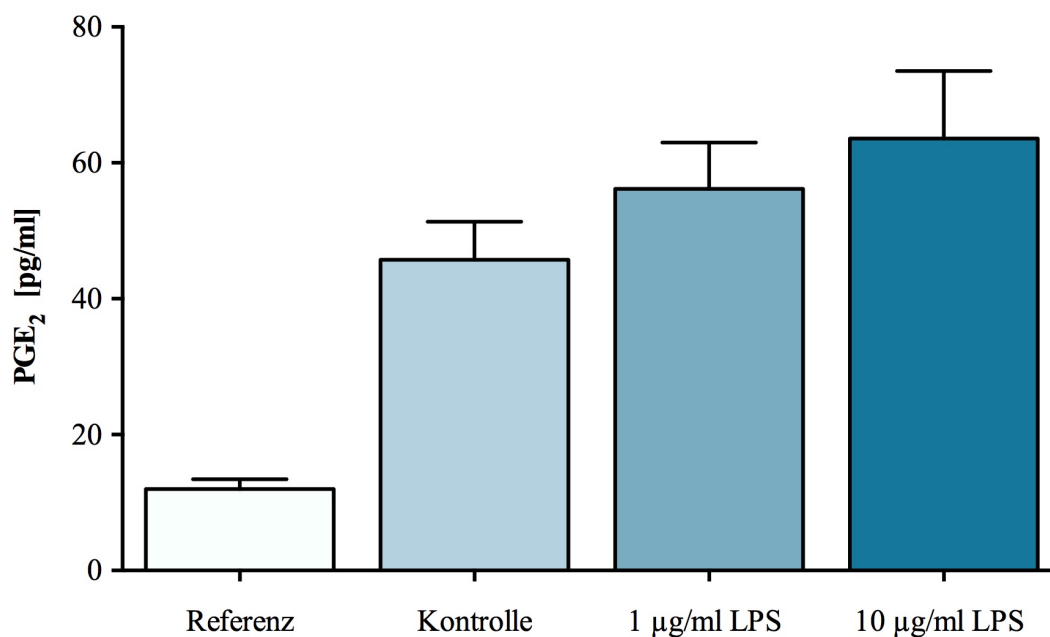


Abbildung 10: Prostaglandin E_2 -Freisetzung aus A549-Zellen

Die Zellen wurden in Gegenwart von $2,5 \mu M$ Arachidonsäure über 24 Stunden mit den angegebenen LPS-Konzentrationen oder Kontrollmedium (Kontrolle) stimuliert. Als Referenzwert diente die basale Sekretion von PGE_2 aus unstimulierten Zellen in Abwesenheit von Arachidonsäure. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Versuchen.

3.7 Prostaglandinrezeptor-Expressionsprofile

Nachdem gezeigt werden konnte, dass PGE_2 , jedoch nicht TxA_2 , von den Tumorzelllinien sezerniert wird, fokussierten wir uns weiter auf die Rolle von PGE_2 und seinen Rezeptoren (EP) bei der LPS-induzierten Tumorzellproliferation. Es sollte überprüft werden, welche EP-Subtypen in den verwendeten Zelllinien konstitutiv auf mRNA-Ebene exprimiert werden. Zudem wurde untersucht, ob es unter Stimulation mit Endotoxin möglicherweise zu einer Regulation der EP-Expression auf mRNA-Ebene kommt. Tabelle 9 zeigt die basale Expression der EP1-EP4 an den verschiedenen Zelllinien. Prinzipiell sind alle Rezeptoren an allen Zelllinien exprimiert. Der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert gibt an, inwieweit sich die LPS-stimulierten Proben von den unstimulierten Kontrollen bezüglich der EP-Expression unterscheiden. Positive $\Delta\Delta\text{CT}$ Werte (Berechnung: $\Delta\text{CT-LPS} - \Delta\text{CT-Kontrolle}$) entsprechen demnach einer Hochregulation des mRNA-Signals für den entsprechenden Rezeptor. Die Rezeptoren EP1, EP2 und EP3 werden an den Adenokarzinomzelllinien A549 und H1299 nach Stimulation mit LPS leicht hochreguliert, der EP4 jeweils herunterreguliert. Für die Zelllinie H226 findet sich eine Hochregulation lediglich bei dem EP1.

a) A549

Prostaglandinrezeptor	ΔCt - Kontrolle	ΔCt -LPS (10 $\mu\text{g/ml}$)	$\Delta\Delta\text{Ct}$ ($=\Delta\text{Ct}$ -LPS - ΔCt -Kontrolle)	fold-change ($=2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$)
EP1	-11,38	-10,56	0,82	1,77
EP2	-6,82	-5,94	0,88	1,84
EP3	-9,10	-8,78	0,32	1,25
EP4	-7,31	-8,02	-0,71	0,61

b) H1299

Prostaglandinrezeptor	ΔCt - Kontrolle	ΔCt -LPS (10 $\mu\text{g/ml}$)	$\Delta\Delta\text{Ct}$ ($=\Delta\text{Ct}$ -LPS - ΔCt -Kontrolle)	fold-change ($=2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$)
EP1	-6,89	-6,19	0,70	1,62
EP2	-15,43	-14,31	1,12	2,17
EP3	-9,97	-9,51	0,46	1,38
EP4	-5,50	-5,93	-0,43	0,74

c) H226

Prostaglandinrezeptor	ΔCt - Kontrolle	ΔCt -LPS (10 $\mu\text{g/ml}$)	$\Delta\Delta\text{Ct}$ ($=\Delta\text{Ct}$ -LPS - ΔCt -Kontrolle)	fold-change ($=2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$)
EP1	-11,46	-10,75	0,71	1,64
EP2	-9,01	-9,175	-0,08	0,95
EP3	-12,81	-13,83	-1,02	0,49
EP4	-9,70	-10,60	-0,90	0,54

Tabelle 9: Expressionsprofile der Prostaglandinrezeptor-mRNA

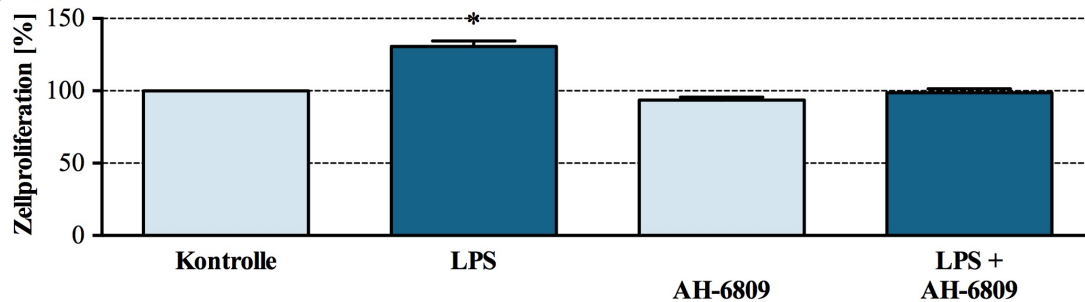
Dargestellt sind die Messwerte in ΔCt ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct Referenzgen} - \text{Ct Zielgen}$), bei denen sich das Fluoreszenzsignal gerade von dem Hintergrundsignal unterscheidet, sowie die errechneten fold-change-Werte.

3.8 Effekt des Prostaglandinrezeptor-Antagonisten AH-6809 auf die LPS-induzierte Zellproliferation

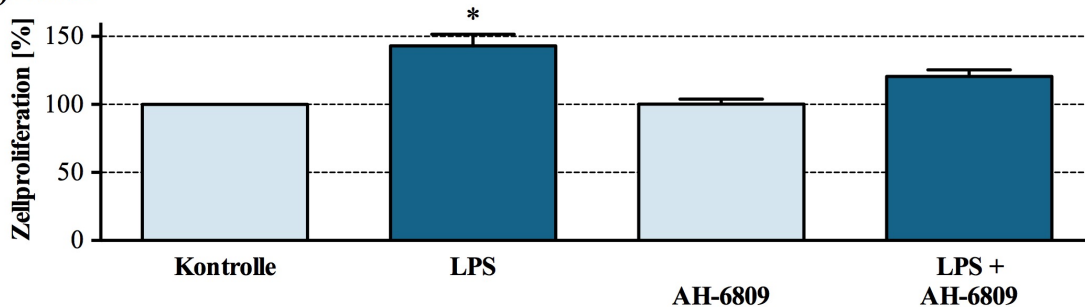
Nachdem sich gezeigt hatte, dass der Cyclooxygenase-2 eine entscheidende Rolle bei der LPS-vermittelten Zellproliferation der untersuchten Zellreihen zukommt, PGE₂ im Gegensatz zu Thromboxan A₂ nach LPS-Stimulation sezerniert wird und zudem die EP-Rezeptoren 1-3 nach Stimulation mit LPS auf mRNA-Ebene tendenziell eine Hochregulation erfahren, wurde ein breiter EP-Antagonist eingesetzt, um die vermutete Rolle von PGE₂ bei der LPS-induzierten Tumorzellproliferation zu untermauern.

Zum Einsatz kam der EP-Antagonist AH-6809, der mit etwa gleicher Affinität eine inhibitorische Wirkung auf EP1, EP2, und EP3 zeigt.⁹⁰ Wie in den mit COX-Antagonisten durchgeführten Versuchen war unser Ziel, eine Konzentration des Rezeptorantagonisten zu finden, die selbst keinen Einfluss auf die basale Proliferation der Zellen, aber einen nachgewiesenen inhibitorischen Effekt auf die Rezeptoraktivierung hat. AH-6809 zeigte in einer Konzentration von 10 µM keinerlei Einfluss auf die basale Zellproliferation an allen drei Zelllinien (Abbildung 11). LPS wurde in diesen Versuchen an den Adenokarzinomzelllinien A549 und H1299 in einer Konzentration von 10 µg/ml, bei der Plattenepithelkarzinomlinie H226 mit 1 µg/ml eingesetzt. Interessanterweise konnte in Gegenwart von 10 µM AH-6809 an allen drei Zelllinien die LPS-induzierte Proliferationssteigerung eindrucksvoll auf Niveau der unstimulierten Kontrolle gesenkt werden. So induzierte eine 24-stündige Inkubation mit LPS an A549-Zellen eine Proliferationssteigerung auf 130,8 % gegenüber der unstimulierten Kontrolle, die durch AH-6809 auf 98,7 % reduziert wurde (Abbildung 11a). Auch an den Zelllinien H1299 und H226 war der stimulatorische Effekt von LPS durch Antagonisierung der Prostaglandinrezeptoren aufgehoben, ohne dass der Rezeptorantagonist die basale Proliferation der Zellen hemmte (Abbildung 11b, c).

a) A549



b) H1299



c) H226

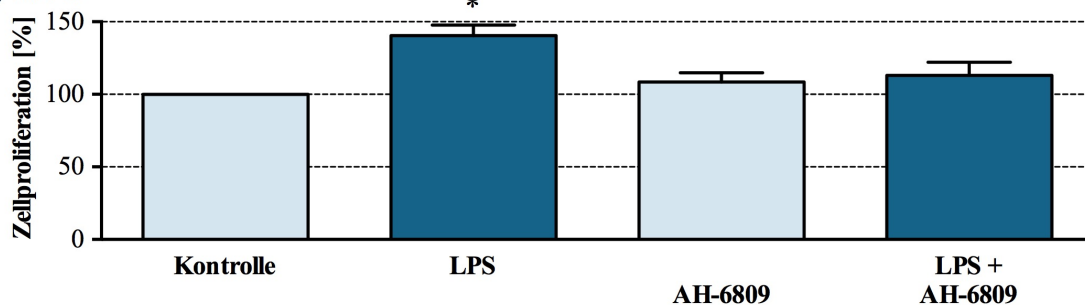


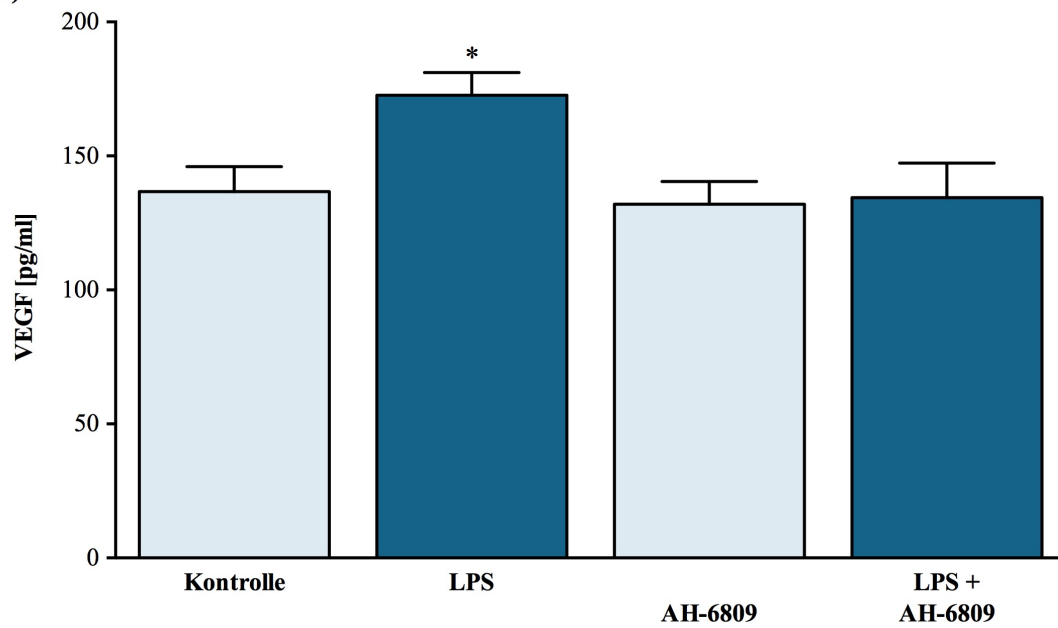
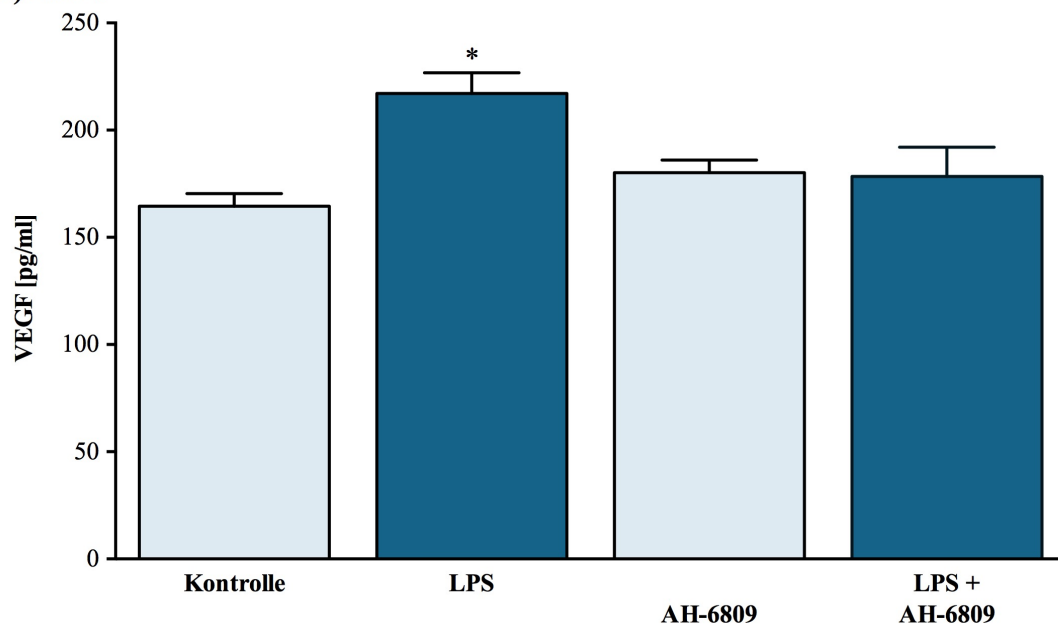
Abbildung 11: Hemmung der LPS-abhängigen Proliferationszunahme durch den Prostaglandinrezeptor-Antagonisten AH-6809

Die Zellen wurden mit 10 µg/ml LPS (H226 mit 1 µg/ml LPS) oder Kontrollmedium (Kontrolle) in Ab- oder Anwesenheit des EP-Antagonisten AH-6809 über 24 Stunden inkubiert. Die Zellzahl wurde mittels automatisierter Zellzählung ermittelt und ist prozentual bezogen auf die unstimulierte Kontrolle dargestellt. Messwerte, welche mit * gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle (*= $p < 0,05$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von mindestens sechs unabhängigen Experimenten.

3.9 Inhibitorischer Effekt des EP-Antagonisten auf die LPS-medierte VEGF-Sekretion

Die Sekretion des pro-angiogenen Faktors VEGF spielt eine zentrale Rolle bei der Tumorzellproliferation *in vivo*. Daher sollte abschließend überprüft werden, ob LPS neben seinen direkten pro-proliferativen Effekten auch die Freisetzung von VEGF in den verwendeten Zelllinien induziert. Weiterhin sollte geklärt werden, ob ein möglicher Effekt von LPS durch Zugabe des EP-Antagonisten AH-6809 beeinflusst werden kann.

Bei allen drei untersuchten Zelllinien konnte bereits in unstimulierten Zellen VEGF quantifiziert werden, wobei die basalen VEGF-Spiegel bei A549-Zellen und H1299-Zellen auf ähnlichem Niveau lagen (136 pg/ml in A549-Zellen bzw. 164 pg/ml in H1299-Zellen). Die basale VEGF-Sekretion der Plattenepithelkarzinomzelllinie H226 lag auf etwas niedrigerem Niveau (102 pg/ml). Ungeachtet des unterschiedlichen Grundniveaus konnte die basale VEGF-Sekretion durch Stimulation mit LPS in allen drei Zelllinien signifikant auf etwa 130 % des Ausgangswertes gesteigert werden (Abbildung 12). Während der EP-Antagonist AH-6809 per se keine wesentliche Veränderung der basalen VEGF-Sekretion bewirkte, konnte bei allen drei Zelllinien die LPS-induzierte Proliferationssteigerung auf das Niveau der unstimulierten Kontrolle gehemmt werden. So induzierte eine 24-stündige Inkubation mit LPS an A549-Zellen eine Steigerung der VEGF-Sekretion von 136 pg/ml auf 172 pg/ml, die in Gegenwart von AH-6809 wieder auf 134 pg/ml aufgehoben werden konnte. Auch an den Zelllinien H1299 und H226 war der stimulatorische Effekt von LPS auf die VEGF-Sekretion durch Antagonisierung der Prostaglandinrezeptoren aufgehoben (Abbildung 12b, c).

a) A549**b) H1229**

c) H226

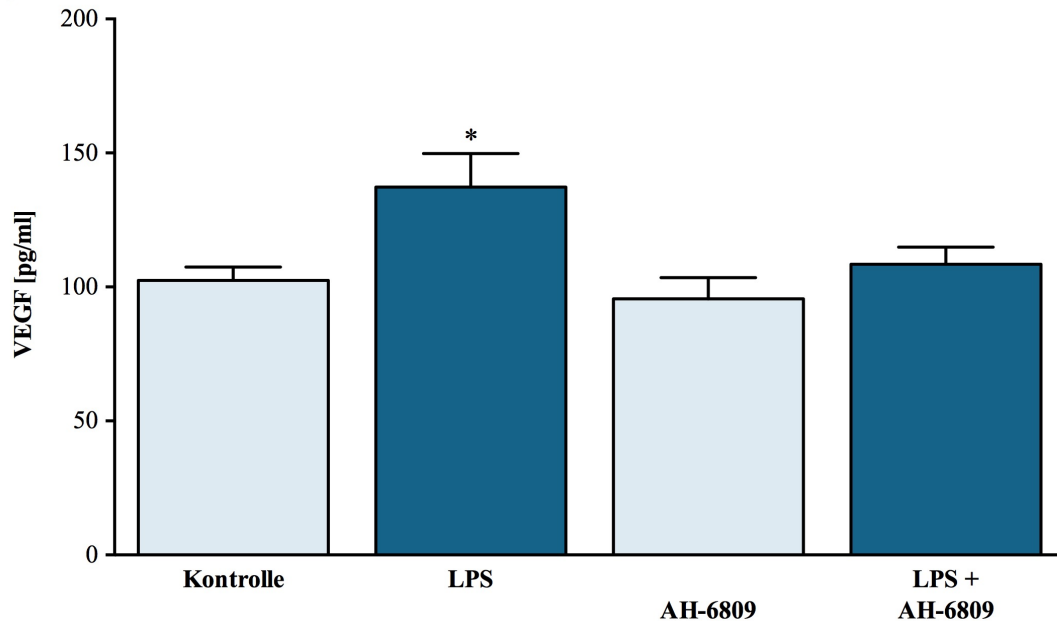


Abbildung 12: LPS-induzierte VEGF-Freisetzung aus NSCLC-Zelllinien: Effekt des EP-Antagonisten

Die Zellen wurden mit 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS (H226 mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS) oder Kontrollmedium (Kontrolle) in Ab- oder Anwesenheit des EP-Antagonisten AH-6809 über 24 Stunden inkubiert. Die VEGF-Konzentration in den Zellüberstand wurde mittels ELISA ermittelt und ist in [pg/ml] angegeben. Messwerte, welche mit * gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle (*= $p < 0,05$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von mindestens vier unabhängigen Experimenten.

4. Diskussion

4.1 Entwicklung der Fragestellung

In den letzten Jahrzehnten haben Infektionen und Inflammationen einen immer höheren Stellenwert in der Genese und Progression von Tumorerkrankungen erhalten.^{24,91} Auch bei Lungenkreberkrankungen wird dieser Zusammenhang immer deutlicher.^{36,37} Hier stellt vor allem das Enzym Cyclooxygenase-2, mit den verschiedenen Prostaglandinen und Thromboxanen als Metaboliten, den Beginn für eine entscheidende Signalkaskade für das Voranschreiten des Tumorwachstums bei NSCLC-Patienten dar. So wurden in vitro wie auch in vivo COX-Inhibitoren wie Celecoxib, Aspirin, Indomethacin und andere nicht-steroidale Antirheumatika mit guten Erfolgen eingesetzt.⁹²⁻⁹⁵ Besonders im Hinblick auf einen Nutzen dieser Erkenntnisse sollte nicht nur das reine Enzym Cyclooxygenase, sondern vielmehr dessen Mediatoren, welche maßgeblich an dem Tumorwachstum beteiligt sind, in dieser Signalkaskade identifiziert und als Zielstrukturen für Pharmaka genutzt werden. Prostaglandin E₂ wird hier ein großer Stellenwert zugemessen.^{61,96}

Wir stellten die Arbeitshypothese auf, dass Infektionen nicht nur Komplikationen eines NSCLC darstellen, sondern selbst zur Tumorprogression beitragen. Innerhalb unserer Arbeitsgruppe wurde diesbezüglich bereits gezeigt, dass das klinisch relevante Bakterientoxin LPS eine Tumorzellproliferation an einem Tiermodell zum Lungenkarzinom, an humanen Lungenkarzinom-Gewebskulturen sowie an der Adenokarzinomzelllinie A549 induzieren kann.⁴²

Zielstellung der vorliegenden Dissertationsschrift war zunächst, diese Effekte an A549-Zellen mit verschiedenen Methoden zu validieren und zu überprüfen, ob sich ein pro-proliferativer Effekt des LPS auch an einer weiteren Adenokarzinomzelllinie (H1299) sowie an der Plattenepithelkarzinomzelllinie H226 darstellen lässt. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sich ein möglicher pro-proliferativer Effekt des LPS durch Inhibition des COX-Stoffwechsels durch Enzyminhibitoren attenuieren lässt. Im nächsten Schritt wurde die Sekretion der COX-Metaboliten PGE₂ und TxA₂ nach Stimulation mit Endotoxin überprüft. Zudem wurde untersucht, ob sich die LPS-induzierte Proliferationssteigerung durch Antagonisierung des COX-Produktes PGE₂ attenuieren lässt. Schließlich sollte überprüft werden, ob LPS auch zu einer Freisetzung

des tumoreigenen Angiogenesefaktors VEGF führt und inwieweit dieser Mechanismus durch Eingriff in den COX-Stoffwechsel beeinflusst werden kann.

4.2 LPS induziert eine zeit- und dosisabhängige Proliferationszunahme an allen NSCLC-Zelllinien: Diskussion der unterschiedlichen Nachweisprinzipien

Zu Beginn der Arbeit verfolgten wir zunächst das Ziel, die LPS-induzierten pro-proliferativen Effekte an A549 zu reproduzieren und zu untersuchen, ob sich diese auch an weiteren Zelllinien darstellen lassen. Somit bildete der erste Teil der vorliegenden Arbeit Versuchsaufbauten zur Untersuchung des Effektes von LPS auf die Proliferation bei den Zellreihen A549, H1299 und H226.

Hierbei bedienten wir uns zunächst verschiedenster Methoden: Die automatisierte Zellzählung stellt ein direktes Messverfahren dar, bei dem über die Messung von elektrischen Widerständen im Probevolumen die Zellzahl vitaler Zellen quantifiziert wird. Indirekte Verfahren, welche zum Einsatz kamen, waren der MTS-Test, der über die Quantifizierung der mitochondrialen Aktivität der Zellen einen Rückschluss auf die Proliferation zulässt⁹⁷, sowie der BrdU ELISA und der ³H-Thymidin-Assay, die beide auf dem Nachweisprinzip des Einbaus markierter Basen(analoga) in die DNA basieren.

Prinzipiell konnte in allen Testverfahren der pro-proliferative Effekt von Endotoxin an der Adenokarzinomzelllinie A549 bestätigt werden und auch an einer weiteren Adenokarzinom- (H1299) und einer Plattenepithelkarzinomzelllinie (H226) reproduziert werden. Jedoch müssen die unterschiedlichen Nachweisprinzipien der verwendeten Testverfahren bei der Interpretation der erhobenen Daten berücksichtigt werden.

Die direkte Zellzahlmessung zeigte an allen drei Zelllinien einen ähnlichen zeitlichen Verlauf, wobei die maximale Steigerung der Zellproliferation durch Stimulation mit Endotoxin bereits nach 24 Stunden quantifiziert werden konnte. Dieser stimulatorische Effekt war über den gesamten Beobachtungszeitraum von 72 Stunden nachweisbar. Der Effekt von Endotoxin war dosisabhängig: während an den Adenokarzinomzelllinien A549 und H1299 10 µg/ml LPS den stärksten Effekt hatten, konnte an der Plattenepithelkarzinomzelllinie H226 durch 1 µg/ml LPS die stärkste zelluläre Proliferation verzeichnet werden. Dieser Anstieg bei bereits geringeren LPS-Konzentrationen könnte mit der Verteilung von Toll-like Rezeptoren (TLR) auf der Zelloberfläche zusammenhängen. TLR4 spielt für die LPS-induzierte Zellproliferation und somit für die Tumormalignität eine entscheidende Rolle^{42,50}. Jedoch zeigen

verschiedene Tumoren keine einheitliche Regulierung dieser Rezeptoren⁹⁸⁻¹⁰⁰. Unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die Plattenepithelzelllinie H226 im Vergleich zu den beiden Adenokarzinomzelllinien A549 und H1299 etwa doppelt soviel mRNA für TLR4 exprimiert, was eine Erklärung für die erhöhte Sensitivität gegenüber LPS darstellen könnte.

Die erhobenen Daten für den MTS-Assay zeigen bei allen drei untersuchten Zellreihen eine MTS-Aktivitätszunahme bereits nach achtstündiger Inkubation mit LPS. Diese Divergenz hinsichtlich des zeitlichen Maximums der Proliferationssteigerung im Vergleich zur direkten Zellzählung könnte darauf begründet sein, dass eine gesteigerte Stoffwechsel- bzw. mitochondriale Aktivität, die im MTS-Assay nachgewiesen wird, der G1-Phase des Zellzyklus entspricht und einer messbaren Zellzahlvermehrung vorangehen sollte. Hinsichtlich der Dosisabhängigkeit des Endotoxin-Effektes entsprechen die im MTS-Assay erhobenen Daten exakt denen der automatisierten Zellzählung, da bei den Zelllinien A549 und H1299 eine Stimulation mit 10 µg/ml LPS den größten Effekt hatte, während in der Zelllinie H226 die maximale Steigerung der Proliferation durch 1 µg/ml LPS erzielt wurde. Somit entsprechen diese Beobachtungen der Veröffentlichung von Cory⁹⁷, der eine starke Übereinstimmung der MTS-Aktivität mit der quantitativen Zellzahlmessung beschreibt. Andererseits zeigen Berridge et al.¹⁰¹, dass bei der vor MTS genutzten Substanz 3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) die für die Reduktion und somit den Farbumschlag benötigten Reduktionsäquivalente extramitochondrialen Ursprungs sein können, was zu divergenten Ergebnissen in Bezug auf die direkte Zellzahlmessung führen könnte, wie wir sie aktuell hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs in dieser Arbeit sehen.

Beim zeitlichen Verlauf muss auch beachtet werden, dass der MTS-Assay lediglich einen Ausschnitt des zu untersuchenden Zeitraums darstellt, da die Inkubation mittels MTS lediglich in den letzten zwei Stunden des Messzeitraums stattfand.

Weitere Testverfahren, um Zellzahlvermehrung zu detektieren, stellen der BrdU ELISA und der ³H-Thymidin-Assay dar. Die gemessenen Daten für den BrdU ELISA, der den Einbau einer modifizierten Base auf DNA-Ebene erzeugt, zeigten folgende Ergebnisse: Für die Zellreihe A549 wurde eine LPS-induzierte Proliferationszunahme nach 24 Stunden quantifizierbar, während bei der kürzeren Inkubationszeit von 8 Stunden noch kein Effekt zu messen war. Da die A549-Zellen eine Verdopplungszeit von etwa 24 Stunden aufweisen und die BrdU-Substanz während der S-Phase in die DNA eingebaut

wird¹⁰², korrelieren diese Ergebnisse gut mit der Kinetik des Proliferationsverhaltens dieser Zelllinie.

Eine weitere zur Proliferation angewandte Methode ist der ³H-Thymidin-Assay, bei dem der Einbau des Pyrimidinanalogons ³H-Thymidin in die DNA quantifiziert wurde. Hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Thymidineinbaus bereits nach achttündiger Inkubationszeit. Quantitativ entsprach die Höhe des Signals mit einem Anstieg des Nukleotideinbaus auf 123 % eher dem in der direkten Zellzählung gemessenen Proliferationsanstieg als den durch den BrdU ELISA generierten Daten, die in Endotoxin-stimulierten Zellen einen Anstieg auf 110 % der unbehandelten Kontrolle zeigten. Diese vergleichsweise niedrigeren pro-proliferativen Effekte von Endotoxin könnten in möglichen toxischen Effekten der Substanz BrdU begründet sein: Im Gegensatz zum ³H-Thymidin, das im Vergleich zu der regulär eingebauten Base lediglich ein zusätzliches Neutron im H-Atom aufweist, besitzt BrdU eine veränderte Struktur und weist ein für die DNA neues Atom, das Brom, auf. Diese drastische Änderung der DNA durch BrdU kann Punktmutationen einzelner Nukleinbasen und DNA-Doppelstrangbrüche verursachen.^{103,104} Des Weiteren wurden inhibitorische Effekte auf Zellproliferationen und Zellteilung und Verlängerungen der Zellzyklen durch die Testsubstanz BrdU beschrieben.^{105,106} Eine weitere Überlegenheit des ³H-Thymidin liegt in dessen stöchiometrischem Markieren der Zellen¹⁰⁷, wodurch ein direkter Rückschluss auf die Zellzahl, anders als beim BrdU ELISA¹⁰⁸, möglich ist.

Zusammenfassend konnte in allen bisher angewandten Proliferationsassays eine Stimulation der Zellproliferation durch Endotoxin gezeigt werden, wenngleich mit unterschiedlicher Kinetik und Ausprägung. Gerade bei den indirekten Verfahren (MTS-Assay, BrdU ELISA, ³H-Thymidin-Assay) müssen die Markierbarkeit der Zellen, mögliche toxische Effekte der Testsubstanz, sowie eine eventuelle Interaktion mit dem verwendeten Stimulus Endotoxin^{109,110} bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden.

Ein Testverfahren, welches diese Überlegungen in den Hintergrund stellt, ist die quantitative Zellzahlmessung. Die erhobenen Daten unter LPS-Stimulation zeigten hier für alle Zellreihen eine dosisabhängige Zellzahlzunahme bei allen Messzeitpunkten. Aufgrund der Vorteile des direkten Testverfahrens wurden im Folgenden alle Versuche zur pharmakologischen Intervention mittels quantitativer Ermittlung der Zellzahl durchgeführt.

4.3 COX-2-Inhibition hemmt selektiv die LPS-induzierte Proliferationszunahme

Die Cyclooxygenase-2 stellt das Schlüsselenzym der LPS-abhängigen Proliferationszunahme bei NSCLC-Zellen dar, was bereits an der Adenokarzinomzelllinie A549 gezeigt wurde.^{42,111} Durch die Zugabe des unselektiven COX-Inhibitors Indomethacin und des selektiven COX-2-Inhibitors NS-398 konnte der proliferationshemmende Effekt auf die Endotoxin-mediierte Zellproliferation an A549-Zellen bestätigt und auch für die Zelllinien H1299 und H226 nachgewiesen werden.

Nach der Stimulation mit 10 µg/ml LPS (1 µg/ml bei H226) war sowohl in den mit dem unselektiven COX-Inhibitor Indomethacin als auch in den mit dem COX-2 spezifischen Inhibitor NS-398 behandelten Zellen die LPS-induzierte Zellproliferation nahezu aufgehoben, ohne dass diese Pharmaka die basale Proliferation beeinflussten. Die Tatsache, dass NS-398 genauso effektiv wie Indomethacin die LPS-induzierte Zellproliferation auf das Niveau der unstimulierten Kontrolle inhibierten, lässt die Vermutung zu, dass die Aktivierung der COX-2 einen zentralen Mechanismus für den proliferationssteigernden Effekt von Endotoxin in den NSCLC-Zelllinien A549, H1299 und H226 darstellt und die COX-1 nur eine untergeordnete Rolle bei der LPS-abhängigen Proliferationszunahme spielt.⁴²

Auffallend ist, dass die eingesetzten Konzentrationen der Pharmaka effektiv die durch LPS stimulierten Zellen im Wachstum hemmen, die basale Proliferation der unstimulierten Zellen jedoch weitestgehend unbeeinflusst lassen. Unsere Daten stimmen mit Untersuchungen von Duan und Zhang überein, die zeigten, dass die COX-2 Inhibition an "ruhenden" A549-Zellen keinen proliferationshemmenden Effekt hat.¹¹¹ Mitchell et al. zeigten ebenfalls auf, dass ohne die Stimulation mit LPS oder verschiedenen Zytokinen die Expression sowohl der COX-1 als auch der COX-2 in A549-Zellen äußerst gering ist. Erst durch die Stimulation konnten größere Mengen der COX-2 quantifiziert werden, die COX-1 unterlag jedoch keiner Hochregulation.¹¹² Auch durch unsere Arbeitsgruppe konnte eine Hochregulation der COX-2 an LPS-stimulierten A549-Zellen und darüber hinaus ebenso in ex-vivo kultiviertem Lungenkarzinomgewebe nachgewiesen werden.⁴²

Die Selektivität der COX-Inhibitoren ist abhängig von der gewählten Konzentration der Pharmaka. So zeigen einige Studien, dass bei ansteigenden Konzentrationen von

COX-2-Inhibitoren auch die basale Proliferation von NSCLC-Zellen zunehmend blockiert wird und die Zellen in Apoptose gehen.¹¹³ Indomethacin stellt ein in diesem Bezug häufig untersuchtes Pharmakon dar. So stellten Sharma et al. fest, dass bei der Zelllinie H226 bereits bei einer Konzentration von 20 μ M Indomethacin etwa 25 % der Zellen untergegangen und nur noch etwa 55 % funktionsfähige Zellen vorhanden sind. Für die Zelllinie H226 wurden in der vorliegenden Arbeit 25 μ M Indomethacin eingesetzt und entgegen den Feststellungen von Sharma et al. konnten wir keine wesentlichen Veränderungen an der basalen Proliferation messen.^{86,114}

Ebenso zeigten in einer Untersuchung von Hung et al. hohe Konzentrationen des selektiven COX-2-Inhibitors NS-398 den Rückgang des Zellwachstums für die Zellreihe A549¹¹⁵, mit Übergang zur Apoptose bei Konzentrationen größer 200 μ M¹¹⁶. Da in der vorliegenden Arbeit jeweils niedrige Konzentrationen von NS-398 (10 und 25 μ M) verwendet wurden, konnten diese unspezifischen und/oder toxischen Effekte von NS-398 ausgeschlossen werden. Somit ist von einer selektiven Hemmung der rein LPS-induzierten Zellproliferation unter den vorgelegten experimentellen Bedingungen auszugehen.

Beim Vergleich der verwendeten Konzentrationen von Indomethacin und NS-398 war auffällig, dass die Konzentration, die die basale Proliferation unbeeinflusst ließ, bei A549-Zellen und H1299-Zellen mit 10 μ M niedriger war als bei H226-Zellen, die eine Inkubation mit 25 μ M erhielten, ohne dass die Proliferation „in Ruhe“ inhibiert wurde. Diese unterschiedliche Sensitivität gegenüber COX-Inhibitoren könnte an unterschiedlichen Expressionsgraden der COX-2 in unstimulierten Zellen liegen.^{86,117}

Die zusammengefasste Betrachtung dieser Ergebnisse zeigt erneut die Schlüsselfunktion der Cyclooxygenase, vor allem der COX-2 bei LPS-induziertem Tumorwachstum bei NSCLC-Zelllinien und -tumoren. Den COX-Inhibitoren Indomethacin und NS-398 konnte bei den hier verwendeten Konzentrationen eine Selektivität für die Blockierung des LPS-induzierten Tumorwachstums nachgewiesen werden, wodurch eine geringere Wachstumsprogression quantifiziert werden konnte.

4.4 Unter den COX-Produkten wird Prostaglandin E₂ präferenziell nach Endotoxin-Stimulation sezerniert

Die Cyclooxygenase metabolisiert das Substrat Arachidonsäure zu den Prostaglandinen und zu Thromboxan A₂. Nachdem eine entscheidende Beteiligung der COX-2 an der Endotoxin-mediierten Tumorzellproliferation demonstriert werden konnte, überprüfen wir im nächsten Schritt, ob auch deren Metaboliten sezerniert werden. Unter den Prostaglandinen scheint dem PGE₂ eine prominente Rolle in der Tumorzellproliferation zuzukommen, da es im Lungenkarzinomgewebe das quantitativ dominierende Prostaglandin darstellt¹¹⁸. In vitro wurden in diversen NSCLC-Zelllinien lediglich PGE₂ und in geringerem Ausmaß Thromboxan A₂ detektiert⁶⁵.

Vor diesem Hintergrund wurde überprüft, ob in Endotoxin-behandelten A549-Zellen eine Sekretion dieser COX-Metaboliten zu verzeichnen war. Im Falle von PGE₂ konnte in Gegenwart des COX-Substrates Arachidonsäure nach Stimulation mit LPS eine dosisabhängige Sekretion im Zellüberstand quantifiziert werden, während die entsprechenden Messwerte für Thromboxan unterhalb der Nachweisgrenze des Testverfahrens lagen. Die hier erhobenen in vitro-Daten stimmen demnach gut mit der Literatur⁶⁵ überein, die zeigt, dass in NSCLC-Zellen PGE₂ präferenziell gegenüber Thromboxan synthetisiert wird.

In Zusammenschau mit weiteren Daten aus in vivo-Studien^{66,119,120} lässt sich aus den erhobenen Daten vermuten, dass PGE₂ den entscheidenden Mediator der COX-2-abhängigen Proliferationszunahme bei NSCLC-Zelllinien darstellt.

Daher sollte im Folgenden die Rolle des PGE₂ in der LPS-induzierten Zellproliferation näher charakterisiert werden.

4.5 Die Schlüsselrolle der Prostaglandinrezeptoren bei der LPS-induzierten Tumorphiliferation

Die Aufklärung der Signalkaskade von der COX-2-Aktivierung über die Freisetzung von PGE₂ bis zur Aktivierung der Prostaglandinrezeptoren lässt womöglich die Entwicklung neuer Medikamente mit spezifischeren Zielen von nachgeschalteten Mediatoren oder Rezeptoren zu als allein das eher unspezifische Ziel der COX-2.⁶¹ An dieser Stelle scheinen die Prostaglandinrezeptoren wichtige Funktionen für die Tumorphiliferation und besonders für das LPS-induzierte Tumorphiliferation zu übernehmen. Wir untersuchten zunächst, welche der Prostaglandinrezeptoren an den verwendeten Zelllinien exprimiert werden und ob die Expression der EP-Rezeptoren einer Regulation durch Endotoxin unterliegt.

In vivo wurde in erster Linie bei NSCLC-Adenokarzinomen und auch bei einigen Plattenepithelkarzinomen eine erhöhte Expression der Prostaglandinrezeptoren EP2 und EP4 festgestellt.^{66,121} An den verwendeten Zelllinien wurden alle vier Rezeptorsubtypen exprimiert. Interessanterweise wurden nach Endotoxin-Stimulation die Rezeptoren EP1, EP2 und EP3 an den Adenokarzinomzelllinien A549 und H1299 leicht hochreguliert; für die Zelllinie H226 findet sich diese Hochregulation lediglich beim EP1.

Daraufhin wurde AH-6809 als breiter EP-Antagonist mit etwa gleicher inhibitorischer Affinität für EP1, EP2 und EP3 eingesetzt.

Bemerkenswerterweise war unter den EP-Antagonisten an allen drei Zelllinien die Endotoxin-medierte Steigerung der Zellproliferation komplett aufgehoben, ohne dass das basale Wachstum der Zellen beeinflusst war. Somit konnten unspezifische, toxische Eigenschaften des eingesetzten Pharmakons AH-6809 ausgeschlossen werden. Unterschiedliche Mechanismen könnten für den inhibitorischen Effekt von AH-6809 verantwortlich gemacht werden. Zum einen scheint die Inkubation mit Endotoxin die Wirkung von sezerniertem PGE₂ über eine Hochregulation der EP1-EP3 zu verstärken; diese Verstärkung wird durch Zugabe des Rezeptorantagonisten unterbunden. Sicher stellt die Hemmung der EP-vermittelten Signaltransduktion einen zentralen inhibitorischen Mechanismus dar: Alle Prostaglandinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, sie unterscheiden sich jedoch in dem „downstream“ der rezeptoraktivierten Signaltransduktion. Interessanterweise werden entscheidende tumoreigene pro-proliferative Rezeptorsysteme direkt oder indirekt durch die EP-

Aktivierung beeinflusst. Beispielsweise scheint das EGFR-System durch PGE₂ aktiviert zu werden: mehrere Untersuchungen beschreiben eine „Transaktivierung“ des EGFR durch PGE₂, wobei sowohl eine Rolle für die Aktivierung des EP1 als auch des EP3 beschrieben wurde.¹²²⁻¹²⁴

Die Interferenz mit dem EGFR-System stellt eine einleuchtende Erklärung für die inhibitorische Wirkung von EP-Antagonisten auf die LPS-induzierte NSCLC-Proliferation dar, da die EGFR-Aktivierung einen zentralen tumoreigenen Wachstumsmechanismus darstellt und auch als „target“ therapeutisch genutzt wird¹⁹⁻²¹. Zudem wurde bereits gezeigt, dass LPS den EGFR-Rezeptor „transaktiviert“, wobei PGE₂ eine zentrale Rolle spielen könnte⁴².

Neben dem EGFR-System spielt die Aktivierung von VEGF eine zentrale Rolle in der Progression des NSCLC. Über die verbesserte Vaskularisation des Tumors hinaus^{74,125} deuten einige Untersuchungen auch auf einen direkten pro-proliferativen Effekt von VEGF hin: Ein Indiz hierfür ist beispielsweise, dass nicht nur Gefäßzellen VEGF-Rezeptoren exprimieren, sondern diese auch auf Zellen von soliden Tumoren identifiziert werden konnten¹²⁶. Darüber hinaus zeigen aktuelle Arbeiten, dass nach der Inhibition von VEGF bei A549 auch die Zellproliferation rückläufig war.^{127,128} Somit könnte VEGF auch einen autokrinen Wachstumsfaktor für NSCLC-Zellen darstellen, weswegen abschließend der Effekt der EP-Antagonisten auf die VEGF-Synthese untersucht wurde.

4.6 Die COX-2-Aktivierung stimuliert über einen autokrinen Loop eine EP-medierte VEGF-Sekretion

Aus den vorangegangenen Überlegungen wurde abschließend die Frage nach der Rolle der EP-Aktivierung bei der Sekretion von VEGF in Endotoxin-stimulierten NSCLC-Zellen abgeleitet.

Die hier erhobenen Daten zeigen, dass es in allen drei Zelllinien zu einem Anstieg von VEGF nach Endotoxin-Stimulation kommt. Die Endotoxin-medierte VEGF-Sekretion wird durch Zugabe des EP-Antagonisten AH-6809 auf Niveau der unstimulierten Kontrolle gehemmt, ohne dass dieses Pharmakon per se die Mediatorsynthese beeinflusst, somit kann von einer spezifischen Inhibition der Endotoxin-vermittelten VEGF-Sekretion ausgegangen werden.

Prinzipiell ist der Zusammenhang zwischen einer Überexpression der COX-2 und einer dadurch bedingten vermehrten Freisetzung von VEGF beispielsweise bei kolorektalen Karzinomen¹²⁹ oder bei papillären Schilddrüsenkarzinomen¹³⁰ bereits bekannt, der genaue Signalweg konnte aber nicht abschließend geklärt werden. Luo et al. postulieren in einer kürzlich erschienenen Arbeit eine Beteiligung der Proteinkinase A und der Proteinkinase C als Schnittstelle zwischen beiden Signalwegen.¹³¹

Ich konnte in meiner Arbeit deutlich herausarbeiten, dass nach der Endotoxin-vermittelten COX-2-Aktivierung die Sekretion von PGE₂ und konsekutive die EP-Aktivierung einen Schlüsselmechanismus darstellt, welcher pro-proliferative Effekte von Endotoxin vermittelt und letztendlich in die VEGF-Synthese mündet.

Die Frage nach der exakten Signaltransduktion ist nicht abschließend geklärt. Letztendlich könnten alle EP-Subtypen die LPS-vermittelte VEGF-Synthese medieren. Diesbezüglich existieren - jedoch in anderen Modellen - Hinweise auf eine Rolle der EP1- und EP3-Aktivierung. So reduzierte ein EP3-Antagonist die Neoangiogenese bei diabetischen Mäusen.¹³² In Lungenkarzinomzellen hemmte ein EP1-Antagonist die basale VEGF-Synthese, wobei die autokrine Aktivierung des HER-2/Neu Systems eine Rolle zu spielen scheint.¹³³

Prinzipiell wäre aber auch eine EP2- oder EP4-vermittelte Aktivierung der VEGF-Synthese denkbar, da diese Rezeptorsubtypen nach der Bindung des Liganden PGE₂ die Adenylatzyklase aktivieren. An Lungenkarzinomzellen wurde gezeigt, dass eine cAMP-

Erhöhung eine Freisetzung von VEGF induzieren kann¹³⁴, weswegen auch die Aktivierung dieser Rezeptorsubtypen eine VEGF-Synthese einleiten kann.

Insgesamt scheint ein redundantes Rezeptorsystem vorzuliegen, dessen Aktivierung jeweils in Zellproliferation und der Synthese von VEGF mündet.

Aus diesen Erkenntnissen könnte man ableiten, dass EP-Antagonisten in der Therapie bei NSCLC-Patienten genauer untersucht werden sollten. Neben ihren direkten proliferationsmindernden Effekten könnte es über die verminderte VEGF-Synthese auch zur Hemmung der Tumorneoangiogenese kommen.

4.7 Ausblick

Einige Aspekte der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden von anderen Arbeitsgruppen bereits soweit spezifiziert, dass klinische Phase-III-Studien durchgeführt wurden. Nicht nur bei der Therapie von Lungenkarzinomen werden Medikamente eingesetzt, welche die COX-2 inhibieren, sondern auch beispielsweise im kolorektalen Karzinomen. Doch obwohl diese Medikamente, hier vor allem die Gruppe der selektiven COX-2-Inhibitoren (Coxibe), gute Ergebnisse in der Therapie wie auch in der Prophylaxe von kolorektalen Karzinomen lieferten, werden sie auf Grund von erhöhten kardiovaskulären Risiken und gastrointestinalen Nebenwirkungen nur zurückhaltend eingesetzt.¹³⁵⁻¹³⁷ Dennoch finden Coxibe auch prophylaktische Anwendung bei einer kleinen Gruppe von genetisch prädisponierten Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP). Diese Patienten würden zu nahezu 100% im Laufe ihres Lebens an einem kolorektalen Karzinom erkranken; unter einer Therapie mit Coxiben konnte jedoch die Karzinogenese unterdrückt und sogar teilweise die Anzahl der Adenome verringert werden.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Ähnliche Ansätze wurden auch in Lungenkarzinomen verfolgt. So wurde beispielsweise das Coxib Celecoxib bereits bei NSCLC-Patienten zur unterstützenden Therapie im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium neben Chemotherapie und Strahlentherapie eingesetzt. Jedoch sprachen nicht alle Patienten gleich gut auf die Therapie an, wodurch die mittlere Überlebenszeit der Patienten, vor allem in inoperablen Stadien des Tumors, sich nicht von Patienten ohne zusätzliche Celecoxib-Therapie unterschied.^{63,141} Mutter et al. stellten jedoch einen Ansatz dar, um über die Konzentration von PGE-M, einem Hauptmetaboliten von PGE₂ im Urin, möglicherweise zwischen "Responder" und "Non-Responder" zu unterscheiden. So sprachen Patienten mit höheren PGE-M Konzentrationen vor der Therapie und Patienten, bei denen nach einer Woche Celecoxib-Einnahme die PGE-M Konzentration stark abfiel, deutlich besser auf dieses Therapieschema an.¹⁴¹

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Höhe von VEGF im Serum eine wichtige Rolle für das Ansprechen der Therapie mit COX-2-Inhibitoren spielt. Je höher die Konzentration von VEGF, desto besser scheinen die Patienten von der Celecoxib-Therapie zu profitieren.¹⁴² Diese Ergebnisse spannen den Bogen zu den uns vorliegenden Ergebnissen, da gezeigt werden konnte, dass die COX-2 nur ein Teil einer

langen Signalkaskade über PGE_2 , EP bis hin zum VEGF und dessen Rezeptoren ist. Eine kurze Übersicht der in dieser Dissertation untersuchten Signalwege und Stoffwechselprodukte von NSCLC bietet Abbildung 13.

Hier ist natürlich auch ein neuer Ansatz für weitere Forschung gegeben, einerseits ein präklinischer Aspekt für den Einsatz eines EP-Antagonisten in einem inflammatorischen Lungenkarzinommodell, andererseits die molekulare Charakterisierung des Zusammenhangs zwischen der EP-Rezeptoraktivierung und der Expression von VEGF. Obwohl auch zu VEGF und dessen Rezeptoren Ergebnisse langjähriger Forschung vorliegen und auch hier bereits Therapien für den klinischen Gebrauch entwickelt wurden⁷¹, könnte gerade im Hinblick auf das verstärkte Tumorwachstum unter Einfluss von bakteriellen Toxinen der Schnittstellen zwischen EP-Aktivierung und VEGF eine größere Bedeutung zukommen.

Bakterielle Infektionen der Atemwege treten oft während der Erkrankung mit Lungenkrebs auf.³⁶ Dabei spielt - durch Infektionen mit gramnegativen Bakterien - LPS eine wichtige Rolle.³⁷ Die in dieser Arbeit aufgezeigte LPS-induzierte Proliferationszunahme bei NSCLC-Zelllinien, welche unter anderem durch den Einsatz des EP-Antagonisten AH-6809 gehemmt werden konnte, führt vielleicht in Zukunft zur Entwicklung nebenwirkungs- und risikoärmerer Medikamente, welche durch diese neuen Ansätze eventuell die Therapie des NSCLC ergänzen können.

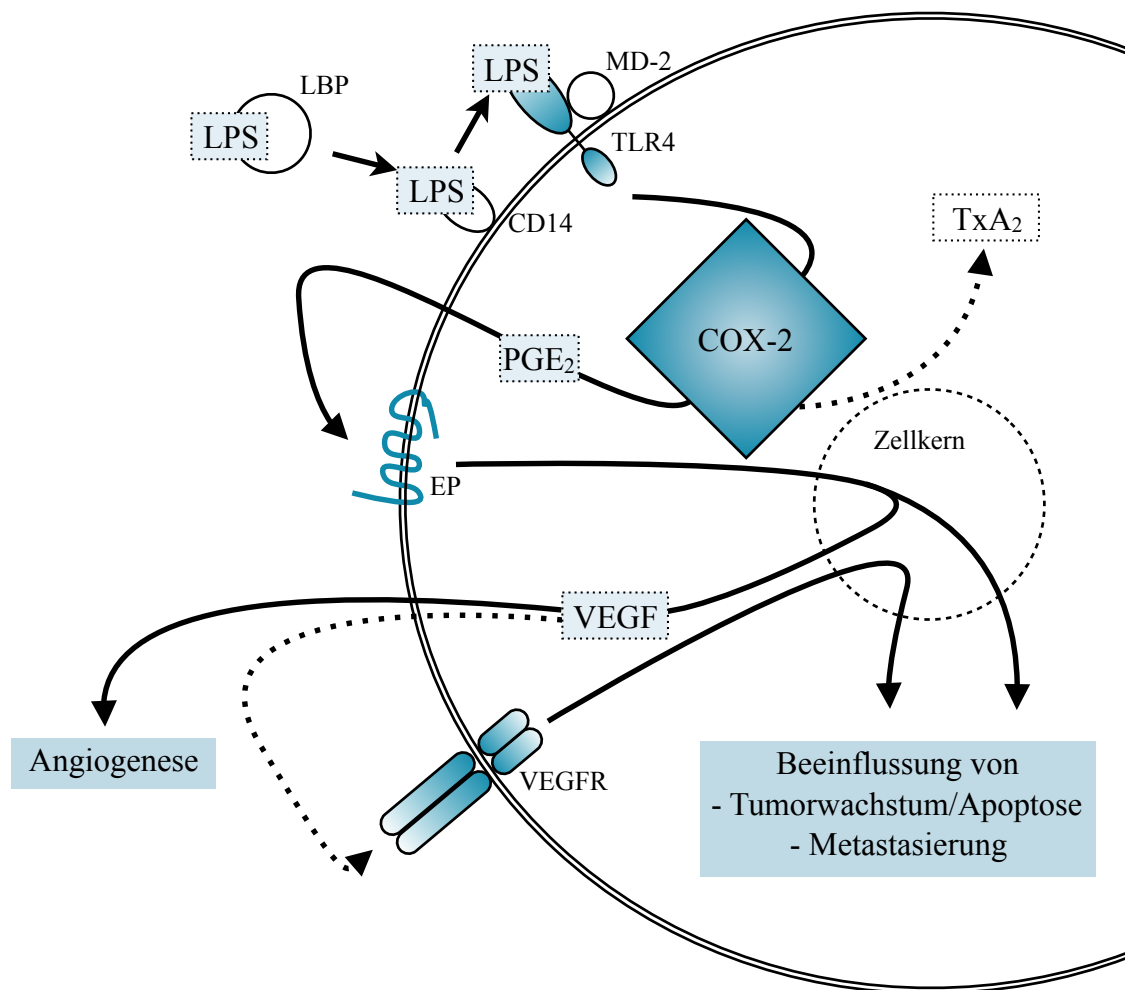


Abbildung 13: Hauptmetabolite und Signalkaskaden der LPS-induzierten Tumorphysik bei NSCLC

Diese Abbildung stellt die in dieser Arbeit hauptsächlich betrachteten und untersuchten Signalwege und -metabolite bei NSCLC-Zelllinien dar:

CD14: cluster of differentiation 14; COX-2: Cyclooxygenase 2; EP Prostaglandinrezeptor; LBP: LPS-Bindungsprotein; LPS: Lipopolysaccharid; PGE₂: Prostaglandin E₂; TLR4: Toll-like Rezeptor 4; TxA₂: Thromboxan A₂; VEGF: vascular endothelial growth factor; VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor

5. Zusammenfassung

Lungenkarzinome haben weltweit eine hohe Inzidenz und Mortalität. Da pulmonale Infektionen zusätzlich zum Lungenkarzinom nicht nur die Diagnose erschweren, sondern auch die Prognose verschlechtert, sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen Infektion und Tumorprogression in der vorliegenden Arbeit genauer betrachtet werden. Hierzu wurden Versuche durchgeführt, bei denen drei NSCLC-Zelllinien (A549, H1299, H226) mit verschiedenen Konzentrationen des Endotoxins LPS, Membranbestandteil von gramnegativen Bakterien, inkubiert wurden. Für alle drei untersuchten Zelllinien konnte eine LPS-induzierte Proliferationszunahme mittels quantitativer Zellzahlmessung, MTS-Assay, BrdU ELISA und ³H-Thymidin-Assay ermittelt werden, wobei die Zellzahlmessung die validesten und reproduzierbarsten Daten ergab. Der Einfluss der COX sollte bei dieser induzierten Proliferationszunahme überprüft werden, da diesem Enzym schon bei verschiedenen anderen Tumorentitäten ein hoher Stellenwert zugeschrieben wurde. Somit wurden der unselektive COX-Inhibitor Indomethacin und der selektive COX-2-Inhibitor NS-398 eingesetzt. Hierbei zeigte sich, dass die Aktivierung der COX-2 entscheidend für die Endotoxin-medierte Zellproliferation war. Unter den COX-Mediatoren konnte lediglich PGE₂ in nennenswerten Konzentrationen nach Endotoxin-Stimulation quantifiziert werden. Die darauf folgende Analyse der PG Prostaglandinrezeptor-Expression zeigte, dass basal alle vier EP-Subtypen EP1-EP4 an allen drei Zelllinien exprimiert werden. Interessanterweise fand sich unter Endotoxin-Stimulation eine Hochregulation der EP1-EP3, weswegen für die folgenden Versuche zur Charaktersierung der Rolle der EP-Aktivierung bei der LPS-vermittelten NSCLC Proliferation der breite EP-Antagonist AH-6809 mit Spezifität für EP1, EP2, und EP3 eingesetzt wurde. In allen drei Zelllinien war in Anwesenheit des EP-Antagonisten die LPS-induzierte Steigerung der Tumorzellproliferation aufgehoben, ohne dass das Pharmakon die basale Proliferation beeinflusste. Schließlich wurde untersucht, ob es unter Endotoxingabe zu einer Sekretion des pro-angiogenen Faktors VEGF kommt und inwieweit hier die EP-Aktivierung eine Rolle spielt. Alle drei Zelllinien zeigten eine erhöhte Konzentration von VEGF im Zellüberstand nach LPS-Stimulation. Dieser Effekt konnte genauso wie die Zellproliferation durch den EP-Antagonisten AH-6809 selektiv blockiert werden. Zusammenfassend induziert Endotoxin eine Proliferation an drei unterschiedlichen

NSCLC-Zelllinien. Die COX-2 anhängige PGE₂-Sekretion und konsekutive EP-Aktivierung scheint sowohl für die pro-proliferativen als auch für die Endotoxin-medierte VEGF-Sekretion zentral involviert zu sein. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten somit Ausgangspunkt für eine gezielte Forschung am Einsatz von Prostaglandinrezeptor-Antagonisten in der Therapie des NSCLC darstellen und die bisherigen therapeutischen Ansätze ergänzen.

6. Summary

Worldwide, the incidence and mortality of lung cancer is high. Since pulmonary infections complicate the diagnosis and even worsen the prognosis of lung cancer, we characterized the reciprocal interactions between pulmonary infection and lung tumor growth in more detail. For that purpose, three NSCLC cell lines (A549, H1299, and H226) were incubated with various concentrations of the endotoxin LPS as a membrane component of gram-negative bacteria. An LPS-induced increase in proliferation could be detected for all three cell lines by means of direct cell quantification, MTS assay, BrdU ELISA and ^3H Thymidine assay, with direct cell quantification producing the most reliable and reproducible data. The role of Cyclooxygenase (COX) - activation was examined in LPS-induced NSCLC proliferation, as this enzyme has been considered to play an essential role in various other tumor entities. Unselective COX-inhibition was performed by indomethacin, while NS-398 was used as selective COX-2-inhibitor. In these experiments, COX-2 activation was shown to be essential for endotoxin-induced cellular proliferation. Among COX-derived metabolites, only PGE_2 was detected in the cell supernatants of endotoxin-stimulated NSCLC-cells. The following characterization of PGE_2 receptor (EP) expression by RT-PCR demonstrated that all EP-subtypes (EP1-EP4) were expressed by the NSCLC cell lines. Interestingly, expression of EP1, EP2, and EP3 was up-regulated upon endotoxin stimulation. Therefore, an EP-receptor antagonist AH-6809, displaying inhibitory activity for these receptor subtypes was used to examine the role of EP-activation in LPS-induced tumor cell proliferation. In all cell lines, AH-6809 completely abrogated the LPS-induced increase in NSCLC proliferation, while basal proliferation was not affected by the EP-antagonist. Finally, we asked whether stimulation with endotoxin was followed by secretion of the pro-angiogenic factor VEGF. Moreover, the role of EP-activation was characterized in this context. In all cell lines, an increase in VEGF-secretion was detected upon exposure to LPS. As previously shown for cellular proliferation, LPS-induced secretion of VEGF was selectively abrogated in the presence of the EP-antagonist AH-6809. In conclusion, endotoxin induced proliferation in three different human NSCLC cell lines. COX-2 dependent secretion of PGE_2 and consecutive activation of specific EP-receptors mediates the pro-proliferative effects of endotoxin. Moreover EP-activation is centrally involved in endotoxin-dependent secretion of

VEGF. These results may give reason for examining the role of EP-activation in NSCLC in more detail and potentially affect the development of future therapeutic strategies in NSCLC.

7. Literaturverzeichnis

- 1 **Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM.** GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Zugriff: <http://globocan.iarc.fr> letzter Zugriff 10/04/2014
- 2 **Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg).** *Krebs in Deutschland 2009/2010*. Berlin, 2013, 9. Auflage.
- 3 **Böcker W, Denk H, Heitz PU.** Pathologie. Urban & Fischer Verlag, 2004, 3. Auflage, 619-627.
- 4 **Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse SF, Kosary CL et al.** SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations). Bethesda, MD, USA: National Cancer Institute; 2012. Zugriff: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/, based on November 2011 SEER data submission, posted to the SEER web site, letzter Zugriff 18/3/2013
- 5 **Kaiser F, Engelhardt M, Rawluk J, Mertelsmann R, Passlick B, Wasch R.** Current treatment concepts of lung cancer. *Dtsch Med Wochenschr.* 2011; 136(38):1901-1906.
- 6 **Paik PK, Johnson ML, D'Angelo SP, Sima CS, Ang D, Dogan S, Miller VA et al.** Driver mutations determine survival in smokers and never-smokers with stage IIIB/IV lung adenocarcinomas. *Cancer.* 2012; 118(23):5840-5847.
- 7 **Dietel M, Johrens K, Laffert M, Hummel M, Blaker H, Muller BM, Lehmann A et al.** Predictive molecular pathology and its role in targeted cancer therapy: a review focussing on clinical relevance. *Cancer Gene Ther.* 2013;
- 8 **Penzel R, Sers C, Chen Y, Lehmann-Muhlenhoff U, Merkelbach-Bruse S, Jung A, Kirchner T et al.** EGFR mutation detection in NSCLC--assessment of diagnostic application and recommendations of the German Panel for Mutation Testing in NSCLC. *Virchows Arch.* 2011; 458(1):95-98.
- 9 **Marchetti A, Felicioni L, Malatesta S, Grazia Sciarrotta M, Guetti L, Chella A, Viola P et al.** Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol.* 2011; 29(26):3574-3579.
- 10 **Barbone F, Bovenzi M, Cavallieri F, Stanta G.** Cigarette smoking and histologic type of lung cancer in men. *Chest.* 1997; 112(6):1474-1479.
- 11 **Sobue T, Yamamoto S, Hara M, Sasazuki S, Sasaki S, Tsugane S.** Cigarette smoking and subsequent risk of lung cancer by histologic type in middle-aged Japanese men and women: the JPHC study. *Int J Cancer.* 2002; 99(2):245-251.
- 12 **Böhm M, Hallek M, Schmiegeler W.** Innere Medizin. Urban & Fischer Verlag, 2009, 6. Auflage, 353-359.
- 13 **Huber RM.** Lung cancer. *Internist (Berl).* 2006; 47(6):611-620.
- 14 **Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J.** Harrison's Principles of Internal Medicine (Single Vol.). McGraw-Hill Professional, 2008, 17. Auflage, 479-748.

- 15 **Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, Branscheid D, Flentje M, Griesinger F, Niederle N et al.** Prevention, diagnosis, therapy, and follow-up of lung cancer. Interdisciplinary guideline of the German Respiratory Society and the German Cancer Society. *Pneumologie*. 2011; 65(8):e51-75.
- 16 **Fruh M, De Ruyscher D, Popat S, Crino L, Peters S, Felip E.** Small-cell lung cancer (SCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013; 24 Suppl 6:vi99-105.
- 17 **Vansteenkiste J, De Ruyscher D, Eberhardt WE, Lim E, Senan S, Felip E, Peters S.** Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013; 24 Suppl 6:vi89-98.
- 18 **Petrosyan F, Daw H, Haddad A, Spiro T.** Targeted therapy for lung cancer. *Anticancer Drugs*. 2012; 23(10):1016-1021.
- 19 **Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P et al.** Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009; 361(10):947-957.
- 20 **Miller VA, Hirsh V, Cadranet J, Chen YM, Park K, Kim SW, Zhou C et al.** Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *Lancet Oncol*. 2012; 13(5):528-538.
- 21 **Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D et al.** Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2005; 353(2):123-132.
- 22 **Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, Ou SH et al.** Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2010; 363(18):1693-1703.
- 23 **Pagano JS, Blaser M, Buendia MA, Damanian B, Khalili K, Raab-Traub N, Roizman B.** Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. *Semin Cancer Biol*. 2004; 14(6):453-471.
- 24 **de Martel C, Franceschi S.** Infections and cancer: established associations and new hypotheses. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009; 70(3):183-194.
- 25 **Kundu JK, Surh YJ.** Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res*. 2008; 659(1-2):15-30.
- 26 **Rajput S, Wilber A.** Roles of inflammation in cancer initiation, progression, and metastasis. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2010; 2:176-183.
- 27 **Wu Y, Zhou BP.** Inflammation: a driving force speeds cancer metastasis. *Cell Cycle*. 2009; 8(20):3267-3273.
- 28 **Algul H, Treiber M, Lesina M, Schmid RM.** Mechanisms of disease: chronic inflammation and cancer in the pancreas--a potential role for pancreatic stellate cells? *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2007; 4(8):454-462.

- 29 **Tselepis C, Perry I, Dawson C, Hardy R, Darnton SJ, McConkey C, Stuart RC et al.** Tumour necrosis factor-alpha in Barrett's oesophagus: a potential novel mechanism of action. *Oncogene*. 2002; 21(39):6071-6081.
- 30 **Arif S, Blanes A, Diaz-Cano SJ.** Hashimoto's thyroiditis shares features with early papillary thyroid carcinoma. *Histopathology*. 2002; 41(4):357-362.
- 31 **Bianchi C, Bianchi T.** Malignant mesothelioma: global incidence and relationship with asbestos. *Ind Health*. 2007; 45(3):379-387.
- 32 **Itzkowitz SH, Yio X.** Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004; 287(1):G7-17.
- 33 **Khurana S, Dubey ML, Malla N.** Association of parasitic infections and cancers. *Indian J Med Microbiol*. 2005; 23(2):74-79.
- 34 **Ardies CM.** Inflammation as cause for scar cancers of the lung. *Integr Cancer Ther*. 2003; 2(3):238-246.
- 35 **Rolston KV.** The spectrum of pulmonary infections in cancer patients. *Curr Opin Oncol*. 2001; 13(4):218-223.
- 36 **Berghmans T, Sculier JP, Klastersky J.** A prospective study of infections in lung cancer patients admitted to the hospital. *Chest*. 2003; 124(1):114-120.
- 37 **Putinati S, Trevisani L, Gualandi M, Guerra G, Rossi MR, Sartori S, Potena A.** Pulmonary infections in lung cancer patients at diagnosis. *Lung Cancer*. 1994; 11(3-4):243-249.
- 38 **Klastersky J.** The infectious complications of bronchial cancer. *Rev Mal Respir*. 1998; 15(4):451-459.
- 39 **Sheng WH, Wang JT, Lin MS, Chang SC.** Risk factors affecting in-hospital mortality in patients with nosocomial infections. *J Formos Med Assoc*. 2007; 106(2):110-118.
- 40 **Hanahan D, Weinberg RA.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5):646-674.
- 41 **Grandel U, Heygster D, Sibelius U, Fink L, Sigel S, Seeger W, Grimminger F et al.** Amplification of lipopolysaccharide-induced cytokine synthesis in non-small cell lung cancer/neutrophil cocultures. *Mol Cancer Res*. 2009; 7(10):1729-1735.
- 42 **Hattar K, Savai R, Subtil FS, Wilhelm J, Schmall A, Lang DS, Goldmann T et al.** Endotoxin induces proliferation of NSCLC in vitro and in vivo: role of COX-2 and EGFR activation. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;
- 43 **Madigan MT, Martinko JM.** Brock Biology of Microorganisms. Pearson, 2005, 11. Auflage, 79-82.
- 44 **Schletter J, Heine H, Ulmer AJ, Rietschel ET.** Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol*. 1995; 164(6):383-389.

- 45 **Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, Kravchenko VV, Akamatsu Y, Nishijima M, Glauser MP et al.** CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity*. 1994; 1(6):509-516.
- 46 **Guha M, Mackman N.** LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*. 2001; 13(2):85-94.
- 47 **Mandell GL, Bennett JE, Dolin R.** Principles and Practice of Infectious Diseases: 2-Volume Set. Churchill Livingstone, 2004, 6. Auflage, 4000.
- 48 **Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F.** Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem*. 1999; 274(16):10689-10692.
- 49 **Yang H, Young DW, Gusovsky F, Chow JC.** Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1. *J Biol Chem*. 2000; 275(27):20861-20866.
- 50 **Zhang YB, He FL, Fang M, Hua TF, Hu BD, Zhang ZH, Cao Q et al.** Increased expression of Toll-like receptors 4 and 9 in human lung cancer. *Mol Biol Rep*. 2009; 36(6):1475-1481.
- 51 **Gryglewski RJ.** Prostacyclin among prostanoids. *Pharmacol Rep*. 2008; 60(1):3-11.
- 52 **Harris RE.** Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. *Inflammopharmacology*. 2009; 17(2):55-67.
- 53 **Fosslien E.** Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci*. 2000; 30(1):3-21.
- 54 **Rostom A, Dube C, Lewin G, Tsertsvadze A, Barrowman N, Code C, Sampson M et al.** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors for primary prevention of colorectal cancer: a systematic review prepared for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2007; 146(5):376-389.
- 55 **Thun MJ, Namboodiri MM, Calle EE, Flanders WD, Heath CWJ.** Aspirin use and risk of fatal cancer. *Cancer Res*. 1993; 53(6):1322-1327.
- 56 **Newton R, Kuitert LM, Bergmann M, Adcock IM, Barnes PJ.** Evidence for involvement of NF-kappaB in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1beta. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 237(1):28-32.
- 57 **Ballaz S, Mulshine JL.** The potential contributions of chronic inflammation to lung carcinogenesis. *Clin Lung Cancer*. 2003; 5(1):46-62.
- 58 **Tennis MA, Vanscoyk M, Keith RL, Winn RA.** The role of prostacyclin in lung cancer. *Transl Res*. 2010; 155(2):57-61.
- 59 **Simmons DL, Botting RM, Hla T.** Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev*. 2004; 56(3):387-437.

- 60 **Karow T, Lang-Roth R.** Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Dr. med. Thomas Karow, 2012, 20. Auflage, 541-550.
- 61 **Wang D, Dubois RN.** Prostaglandins and cancer. *Gut*. 2006; 55(1):115-122.
- 62 **Fosslien E.** Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2000; 37(5):431-502.
- 63 **Csiki I, Morrow JD, Sandler A, Shyr Y, Oates J, Williams MK, Dang T et al.** Targeting cyclooxygenase-2 in recurrent non-small cell lung cancer: a phase II trial of celecoxib and docetaxel. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(18):6634-6640.
- 64 **Zhu YM, Azahri NS, Yu DC, Woll PJ.** Effects of COX-2 inhibition on expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in lung cancer cells. *BMC Cancer*. 2008; 8:218.
- 65 **Hubbard WC, Alley MC, Gray GN, Green KC, McLemore TL, Boyd MR.** Evidence for prostanoid biosynthesis as a biochemical feature of certain subclasses of non-small cell carcinomas of the lung as determined in established cell lines derived from human lung tumors. *Cancer Res*. 1989; 49(4):826-832.
- 66 **Kreutzer M, Fauti T, Kaddatz K, Seifart C, Neubauer A, Schweer H, Komhoff M et al.** Specific components of prostanoid-signaling pathways are present in non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep*. 2007; 18(2):497-501.
- 67 **Sugimoto Y, Narumiya S.** Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem*. 2007; 282(16):11613-11617.
- 68 **Ferrara N.** The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast Cancer Res Treat*. 1995; 36(2):127-137.
- 69 **Folkman J.** What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*. 1990; 82(1):4-6.
- 70 **Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J.** Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 49(10):1015-1026.
- 71 **Korpanty G, Smyth E, Sullivan LA, Brekken RA, Carney DN.** Antiangiogenic therapy in lung cancer: focus on vascular endothelial growth factor pathway. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010; 235(1):3-9.
- 72 **Claesson-Welsh L, Welsh M.** VEGFA and tumour angiogenesis. *J Intern Med*. 2013; 273(2):114-127.
- 73 **Das M, Wakelee H.** Targeting VEGF in lung cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2012; 16(4):395-406.
- 74 **Pallis AG, Syrigos KN.** Targeting tumor neovasculature in non-small-cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012;
- 75 **Taira T, Yamamoto N.** Anti-VEGF therapy for lung cancer. *Nihon Rinsho*. 2012; 70(12):2159-2164.
- 76 **Starakis I, Nikolakopoulos A, Mazokopakis EE.** Targeted therapies for advanced non-small cell lung cancer. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2012; 15(8):641-655.

- 77 **Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilenbaum R et al.** Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2006; 355(24):2542-2550.
- 78 **Twelves C, Chmielowska E, Havel L, Popat S, Swieboda-Sadlej A, Sawrycki P, Bycott P et al.** Randomised phase II study of axitinib or bevacizumab combined with paclitaxel/carboplatin as first-line therapy for patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2014; 25(1):132-138.
- 79 **Chaft JE, Rusch V, Ginsberg MS, Paik PK, Finley DJ, Kris MG, Price KA et al.** Phase II trial of neoadjuvant bevacizumab plus chemotherapy and adjuvant bevacizumab in patients with resectable nonsquamous non-small-cell lung cancers. *J Thorac Oncol.* 2013; 8(8):1084-1090.
- 80 **Schmid-Bindert G.** Update on antiangiogenic treatment of advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Target Oncol.* 2013; 8(1):15-26.
- 81 **Nakahata N.** Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther.* 2008; 118(1):18-35.
- 82 **Nikolova S, Guenther A, Savai R, Weissmann N, Ghofrani HA, Konigshoff M, Eickelberg O et al.** Phosphodiesterase 6 subunits are expressed and altered in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2010; 11:146.
- 83 **Pullamsetti SS, Doebele C, Fischer A, Savai R, Kojonazarov B, Dahal BK, Ghofrani HA et al.** Inhibition of microRNA-17 improves lung and heart function in experimental pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 185(4):409-419.
- 84 **Hanze J, Eul BG, Savai R, Krick S, Goyal P, Grimminger F, Seeger W et al.** RNA interference for HIF-1alpha inhibits its downstream signalling and affects cellular proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 312(3):571-577.
- 85 **Dahal BK, Kosanovic D, Pamarthi PK, Sydykov A, Lai YJ, Kast R, Schirok H et al.** Therapeutic efficacy of azaindole-1 in experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2010; 36(4):808-818.
- 86 **Sharma SD, Meeran SM, Katiyar SK.** Proanthocyanidins inhibit in vitro and in vivo growth of human non-small cell lung cancer cells by inhibiting the prostaglandin E(2) and prostaglandin E(2) receptors. *Mol Cancer Ther.* 2010; 9(3):569-580.
- 87 **Grandel U, Hopf M, Buerke M, Hattar K, Heep M, Fink L, Bohle RM et al.** Mechanisms of cardiac depression caused by lipoteichoic acids from *Staphylococcus aureus* in isolated rat hearts. *Circulation.* 2005; 112(5):691-698.
- 88 **Kudryavtsev IA, Golenko OD, Gudkova MV, Myasishcheva NV.** Arachidonic acid metabolism in growth control of A549 human lung adenocarcinoma cells. *Biochemistry (Mosc).* 2002; 67(9):1021-1026.
- 89 **Avis I, Martinez A, Tauler J, Zudaire E, Mayburd A, Abu-Ghazaleh R, Ondrey F et al.** Inhibitors of the arachidonic acid pathway and peroxisome proliferator-activated receptor ligands have superadditive effects on lung cancer growth inhibition. *Cancer Res.* 2005; 65(10):4181-4190.

- 90 **Abramovitz M, Adam M, Boie Y, Carriere M, Denis D, Godbout C, Lamontagne S et al.** The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1483(2):285-293.
- 91 **Parkin DM.** The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*. 2006; 118(12):3030-3044.
- 92 **Gridelli C, Maione P, Airoma G, Rossi A.** Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors and Non-small Cell Lung Cancer. *CMC*. 2002; 9(21):1851-1858.
- 93 **Peluffo GD, Stillitani I, Rodriguez VA, Diament MJ, Klein SM.** Reduction of tumor progression and paraneoplastic syndrome development in murine lung adenocarcinoma by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Int J Cancer*. 2004; 110(6):825-830.
- 94 **Diament MJ, Peluffo GD, Stillitani I, Cerchietti LC, Navigante A, Ranuncolo SM, Klein SM.** Inhibition of tumor progression and paraneoplastic syndrome development in a murine lung adenocarcinoma by medroxyprogesterone acetate and indomethacin. *Cancer Invest*. 2006; 24(2):126-131.
- 95 **Rogers ES, MacLeod RD, Stewart J, Bird SP, Keogh JW.** A randomised feasibility study of EPA and Cox-2 inhibitor (Celebrex) versus EPA, Cox-2 inhibitor (Celebrex), resistance training followed by ingestion of essential amino acids high in leucine in NSCLC cachectic patients--ACCeRT study. *BMC Cancer*. 2011; 11:493.
- 96 **Sandler AB, Dubinett SM.** COX-2 inhibition and lung cancer. *Semin Oncol*. 2004; 31(2 Suppl 7):45-52.
- 97 **Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG.** Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun*. 1991; 3(7):207-212.
- 98 **Nihon-yanagi Y, Park Y, Ooshiro M, Terai K, Matsumoto T, Murano T, Okazumi S.** Expression of toll-like receptor 4 in colorectal cancer. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2008; 35(12):2247-2249.
- 99 **Sheyhidin I, Nabi G, Hasim A, Zhang RP, Ainiwaer J, Ma H, Wang H.** Overexpression of TLR3, TLR4, TLR7 and TLR9 in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2011; 17(32):3745-3751.
- 100 **Lee SK, Il Kim T, Kim YK, Choi CH, Yang KM, Chae B, Kim WH.** Cellular differentiation-induced attenuation of LPS response in HT-29 cells is related to the down-regulation of TLR4 expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 337(2):457-463.
- 101 **Berridge MV, Tan AS.** Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*. 1993; 303(2):474-482.

- 102 **Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW.** Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol.* 1989; 18(3):311-318.
- 103 **Bannigan J, Langman J.** The cellular effect of 5-bromodeoxyuridine on the mammalian embryo. *J Embryol Exp Morphol.* 1979; 50:123-135.
- 104 **Saffhill R, Ockey CH.** Strand breaks arising from the repair of the 5-bromodeoxyuridine-substituted template and methyl methanesulphonate-induced lesions can explain the formation of sister chromatid exchanges. *Chromosoma.* 1985; 92(3):218-224.
- 105 **Morris SM.** The genetic toxicology of 5-bromodeoxyuridine in mammalian cells. *Mutat Res.* 1991; 258(2):161-188.
- 106 **Taupin P.** BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev.* 2007; 53(1):198-214.
- 107 **Nowakowski RS, Rakic P.** Clearance rate of exogenous 3H-thymidine from the plasma of pregnant rhesus monkeys. *Cell Tissue Kinet.* 1974; 7(2):189-194.
- 108 **Nowakowski RS, Hayes NL.** New neurons: extraordinary evidence or extraordinary conclusion? *Science.* 2000; 288(5467):771.
- 109 **Pollack A, Bagwell CB, Hudson JL, Irvin GLr.** Differences in flow cytometry and 3H-thymidine analyses of perturbed human lymphocytes. *J Histochem Cytochem.* 1979; 27(1):486-490.
- 110 **Marmer DJ, Steele RW.** Comparison of flow cytometric analysis and [3H]thymidine incorporation for measurement of the effects of drug toxicity on lymphocyte stimulation. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983; 24(4):605-608.
- 111 **Duan W, Zhang L.** Cyclooxygenase inhibitors not inhibit resting lung cancer A549 cell proliferation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2006; 74(5):317-321.
- 112 **Mitchell JA, Belvisi MG, Akarasereenont P, Robbins RA, Kwon OJ, Croxtall J, Barnes PJ et al.** Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. *Br J Pharmacol.* 1994; 113(3):1008-1014.
- 113 **Hida T, Kozaki K, Muramatsu H, Masuda A, Shimizu S, Mitsudomi T, Sugiura T et al.** Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(5):2006-2011.
- 114 **Kato T, Fujino H, Oyama S, Kawashima T, Murayama T.** Indomethacin induces cellular morphological change and migration via epithelial-mesenchymal transition in A549 human lung cancer cells: A novel cyclooxygenase-inhibition-independent effect. *Biochem Pharmacol.* 2011;

- 115 **Hung WC, Chang HC, Pan MR, Lee TH, Chuang LY.** Induction of p27(KIP1) as a mechanism underlying NS398-induced growth inhibition in human lung cancer cells. *Mol Pharmacol.* 2000; 58(6):1398-1403.
- 116 **Qiu R, Chen J, Sima J, Shen X, Liu D, Shen J.** NS398 induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012; 138(1):119-124.
- 117 **Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimäki A.** Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res.* 1998; 58(22):4997-5001.
- 118 **McLemore TL, Hubbard WC, Litterst CL, Liu MC, Miller S, McMahon NA, Eggleston JC et al.** Profiles of prostaglandin biosynthesis in normal lung and tumor tissue from lung cancer patients. *Cancer Res.* 1988; 48(11):3140-3147.
- 119 **Yoshimoto A, Kasahara K, Kawashima A, Fujimura M, Nakao S.** Characterization of the prostaglandin biosynthetic pathway in non-small cell lung cancer: a comparison with small cell lung cancer and correlation with angiogenesis, angiogenic factors and metastases. *Oncol Rep.* 2005; 13(6):1049-1057.
- 120 **Wei J, Yan W, Li X, Ding Y, Tai HH.** Thromboxane receptor alpha mediates tumor growth and angiogenesis via induction of vascular endothelial growth factor expression in human lung cancer cells. *Lung Cancer.* 2010; 69(1):26-32.
- 121 **Alaa M, Suzuki M, Yoshino M, Tian L, Suzuki H, Nagato K, Fujiwara T et al.** Prostaglandin E2 receptor 2 overexpression in squamous cell carcinoma of the lung correlates with p16INK4A methylation and an unfavorable prognosis. *Int J Oncol.* 2009; 34(3):805-812.
- 122 **Taub M, Parker R, Mathivanan P, Ariff MA, Rudra T.** Antagonism of the prostaglandin E2 EP1 receptor in MDCK cells increases growth through activation of Akt and the epidermal growth factor receptor. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014; 307(5):F539-50.
- 123 **Kim S, Lewis C, Nadel JA.** Epidermal growth factor receptor reactivation induced by E-prostanoid-3 receptor- and tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme-dependent feedback exaggerates interleukin-8 production in airway cancer (NCI-H292) cells. *Exp Cell Res.* 2011; 317(18):2650-2660.
- 124 **Fernandez-Martinez AB, Lucio Cazana FJ.** Epidermal growth factor receptor transactivation by intracellular prostaglandin E2-activated prostaglandin E2 receptors. Role in retinoic acid receptor-beta up-regulation. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1833(9):2029-2038.
- 125 **Kerbel RS.** Tumor angiogenesis. *N Engl J Med.* 2008; 358(19):2039-2049.
- 126 **Wey JS, Stoeltzing O, Ellis LM.** Vascular endothelial growth factor receptors: expression and function in solid tumors. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2004; 2(1):37-45.
- 127 **Wang Y, Huang L, Yang Y, Xu L, Yang J, Wu Y.** Effects of autocrine vascular endothelial growth factor (VEGF) in non-small cell lung cancer cell line A549. *Mol Biol Rep.* 2013;

- 128 **Jin K, He K, Teng F, Li G, Wang H, Han N, Xu Z et al.** FP3: a novel VEGF blocker with antiangiogenic effects in vitro and antitumour effects in vivo. *Clin Transl Oncol.* 2011; 13(12):878-884.
- 129 **Garcea G, Sharma RA, Dennison A, Steward WP, Gescher A, Berry DP.** Molecular biomarkers of colorectal carcinogenesis and their role in surveillance and early intervention. *Eur J Cancer.* 2003; 39(8):1041-1052.
- 130 **Siironen P, Ristimäki A, Narko K, Nordling S, Louhimo J, Andersson S, Haapiainen R et al.** VEGF-C and COX-2 expression in papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2006; 13(2):465-473.
- 131 **Luo H, Chen Z, Jin H, Zhuang M, Wang T, Su C, Lei Y et al.** Cyclooxygenase-2 up-regulates vascular endothelial growth factor via a protein kinase C pathway in non-small cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011; 30:6.
- 132 **Oba K, Hosono K, Amano H, Okizaki S, Ito Y, Shichiri M, Majima M.** Downregulation of the proangiogenic prostaglandin E receptor EP3 and reduced angiogenesis in a mouse model of diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother.* 2014; 68(8):1125-1133.
- 133 **Su JL, Shih JY, Yen ML, Jeng YM, Chang CC, Hsieh CY, Wei LH et al.** Cyclooxygenase-2 induces EP1- and HER-2/Neu-dependent vascular endothelial growth factor-C up-regulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2004; 64(2):554-564.
- 134 **Casibang M, Purdom S, Jakowlew S, Neckers L, Zia F, Ben-Av P, Hla T et al.** Prostaglandin E2 and vasoactive intestinal peptide increase vascular endothelial cell growth factor mRNAs in lung cancer cells. *Lung Cancer.* 2001; 31(2-3):203-212.
- 135 **Garcia Rodriguez LA, Cea-Soriano L, Tacconelli S, Patrignani P.** Coxibs: pharmacology, toxicity and efficacy in cancer clinical trials. *Recent Results Cancer Res.* 2013; 191:67-93.
- 136 **Arber N.** Cyclooxygenase-2 inhibitors in colorectal cancer prevention: point. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17(8):1852-1857.
- 137 **Jankowski J, Hunt R.** Cyclooxygenase-2 inhibitors in colorectal cancer prevention: counterpoint. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17(8):1858-1861.
- 138 **Huang K, Gutierrez LP, Bulow S, Gallinger S, Castells A, Eagle CJ, Church JM.** Clinical characteristics and outcomes in familial adenomatous polyposis patients with a long-term treatment of celecoxib: a matched cohort study. *Fam Cancer.* 2011; 10(2):303-308.
- 139 **Iwama T.** NSAIDs and colorectal cancer prevention. *J Gastroenterol.* 2009; 44 Suppl 19:72-76.
- 140 **Thakkar K, Fishman DS, Gilger MA.** Colorectal polyps in childhood. *Curr Opin Pediatr.* 2012; 24(5):632-637.

- 141 **Mutter R, Lu B, Carbone DP, Csiki I, Moretti L, Johnson DH, Morrow JD *et al.*** A phase II study of celecoxib in combination with paclitaxel, carboplatin, and radiotherapy for patients with inoperable stage IIIA/B non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(6):2158-2165.
- 142 **Gasparini G, Meo S, Comella G, Stani SC, Mariani L, Gamucci T, Avallone A *et al.*** The combination of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib with weekly paclitaxel is a safe and active second-line therapy for non-small cell lung cancer: a phase II study with biological correlates. *Cancer J.* 2005; 11(3):209-216.

8. Abkürzungs- und Fremdwortverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ACTH	Adrenocortikotrophes Hormon
ALK	anaplastic lymphoma kinase
Blank	Wells, in denen der Versuchsaufbau ohne Zellen durchgeführt wird
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BrdU	5-Brom-2'-Deoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
C	Konzentration
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD14	cluster of differentiation 14
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
COX	Cyclooxygenase
Coxibe	Cyclooxygenase-2-Inhibitoren
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DPBS	Dulbecco's Phosphat - gepufferte Salzlösung
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme linked immunoabsorbent assay
EP	Prostaglandinrezeptor E
EP-A	Prostaglandinrezeptor(E)-Antagonist
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	fetal calf serum
GPCR	G protein-coupled receptor, G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HBSS	Hank's balanced salt solution
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LPS	Lipopolysaccharid
MD-2	auch bekannt als Lymphozyten-Antigen 96
mRNA	messenger ribonucleic acid
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NF- κ B	Nukleus Faktor kappaB
NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika
NSCLC	non-small cell lung cancer, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
PDGD	Porphobilinogen Deaminase
PG	Prostaglandin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂

PIGF	placental growth factor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SCLC	small cell lung cancer, kleinzelliges Lungenkarzinom
TNF- α	Tumornekrosisfaktor- α
TxA ₂	Thromboxan A ₂
TxB ₂	Thromboxan B ₂
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
Well	Vertiefung in einer Mikrotiterplatte

9. Publikationen

Abstract mit Posterdiskussion

Linsel S, Grandel U, Dahlem G, Savai R, Pamarthi PK, Sibelius U, Grimminger F, Seeger W, Hattar K. Endotoxin stimulates proliferation and VEGF secretion of human NSCLC cell lines in vitro - role of COX-metabolism and EP-receptor activation. *Oncology Res Treat* 2014;37 (Suppl 5): 68, P228.

10. Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift

11. Danksagung

Bedanken möchte ich mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. F. Grimminger sowie bei Herrn Prof. Dr. med. U. Sibelius für die Vergabe des herausfordernden Promotionsthemas und die Bereitstellung der umfangreichen materiellen und räumlichen Voraussetzungen für diese Promotionsarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Katja Hattar und PD Dr. med. Ulrich Grandel, einerseits für die wissenschaftliche Betreuung und Beratung bezüglich des erarbeiteten Themas, andererseits für das Vertrauen in meine Fähigkeiten und Arbeitsweisen während der experimentellen Arbeit.

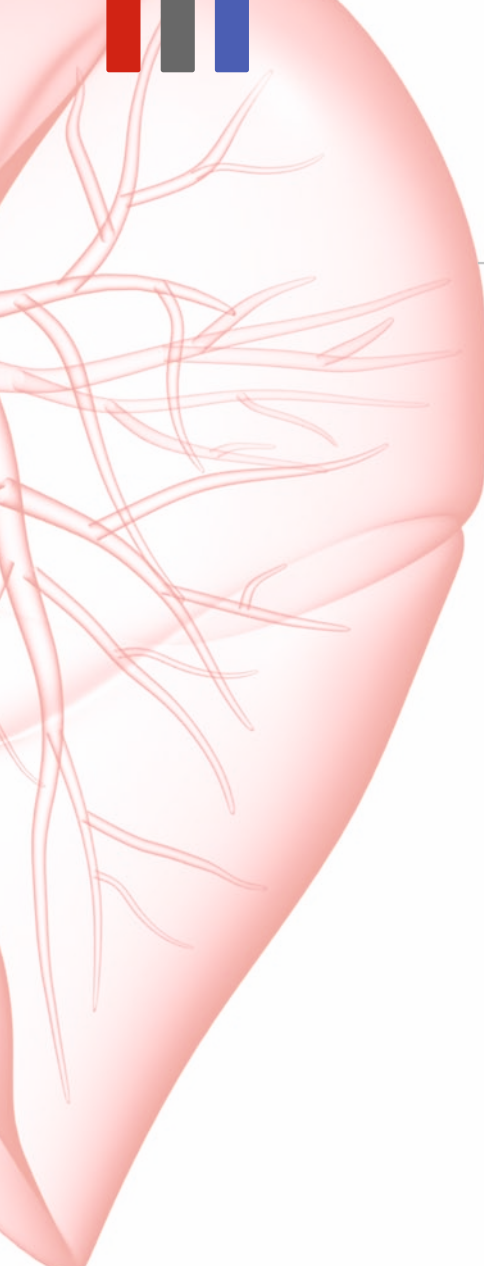
Dank gilt auch Dr. Rajkumar Savai und Pavan Kumar Pamarthi für die Messung der ^3H -Thymidin-Assays sowie der EP-Expressionsprofile.

Ebenfalls möchte ich mich sehr bei Frau Gabriele Dahlem und Frau Susanna Ziegler bedanken. Viele Probleme und Fragen während der experimentellen Arbeit im Labor konnten durch sie schnell und einfach gelöst und beantwortet werden.

Weiterhin möchte ich all jenen danken, die mich auf meinem Weg prägten, begleiteten, unterstützten, und mir voller Liebe beharrlich zur Seite standen. Danke!

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**



édition scientifique 
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6437-2



9 783835 196437 2

Photo cover: © abhijith3747 @ fotolia.de